ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Année 1962 N° 12

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES COLORATIONS par immuno-fluorescence

ÉTALONNAGE DES SÉRUMS

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1962

DEVANT LA

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE TOULOUSE

PAR

Jean, Théophile, Pierre CHARNY

né le 27 Novembre 1916, à Saint-Bonnet-de-Montaraux (Lozère)

JURY
- *Président* : M. ANDRIEU, Profes. à la Faculté de Médecine.
- *Assesseurs* : M. SAURAT, Profess. à l'Ecole Vétérinaire
- *Assesseurs* : M. PUGET, Professeur à l'Ecole Vétérinaire.

1962

LES IMPRESSIONS OFFTYP

11, rue Saint-Papoul

TOULOUSE

Contribution à l'étude des Colorations par immuno-fluorescence

Etalonnage des Sérums

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Année 1962 N° 12

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES COLORATIONS par immuno-fluorescence

ÉTALONNAGE DES SÉRUMS

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1962

DEVANT LA

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE TOULOUSE

PAR

Jean, Théophile, Pierre CHARNY

né le 27 Novembre 1916, à Saint-Bonnet-de-Montaraux (Lozère)

JURY
- *Président* : M. ANDRIEU, Profes. à la Faculté de Médecine.
- *Assesseurs* : M. SAURAT, Profess. à l'Ecole Vétérinaire
- *Assesseurs* : M. PUGET, Professeur à l'Ecole Vétérinaire.

1962

LES IMPRESSIONS OFFTYP

11, rue Saint-Papoul

TOULOUSE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

PERSONNEL ENSEIGNANT

	MM.
Directeur	PONS.
Professeur honoraire	LASSERRE.

PROFESSEURS

Physique et Chimie Biologique	GODFRAIN.
Pharmacie et Toxicologie	»
Hygiène du Lait	»
Anatomie descriptive - Extérieur	BLIN.
Anatomie appliquée	»
Physiologie et Thérapeutique	LE BARS.
Pharmacodynamie	»
Histologie - Embryologie	LOMBARD.
Anatomie Pathologique	»
Inspection des Viandes	»
Zoologie appliquée	BRIZARD.
Parasitologie externe	»
Parasitologie interne	»
Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores	DARRASPEN.
Législation vétérinair e	»
Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour	TOURNUT.
Technique chirurgicale	PUGET.
Pathologie chirurgicale	»
Pathologie de la Reproduction	BERTHELON.
Obstétrique	»
Microbiologie - Immunologie	SAURAT.
Maladies contagieuses	»
Police sanitaire	»
Ethnologie	PONS.
Hygiène	»
Zootechnie	»
Economie Rurale	»
Alimentation	FALIU.
Botanique	»
Agronomie	»

CHEFS DE TRAVAUX

Maladies Contagieuses	LAUTIÉ, Agrégé.
Pathologie Médicale - Législation Vétérinaire	LESCURE, Agrégé.
Anatomie Pathologique	GOULARD.
Pathologie Chirurgicale	CAZIEUX.
Pathologie de la Reproduction	ROYAL.
Chimie	MILHAUD.

COURS COMPLEMENTAIRES CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Radiologie	AUVERGNAT.
Droit Vétérinaire	LINON.
Botanique	MORQUER.
Pisciculture	SECONDAT.
Agronomie	BRISEBOIS.
Economie Rurale	M. DE LA ROQUE.

ASSISTANT

Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour	LACAZE.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 juin 1924).

A MES PARENTS

Que leur mémoire trouve ici un faible témoignage de ma reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils se sont imposés.

A MA FEMME

Avec tout mon amour.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRIEU

de la Faculté de Médecine de Toulouse

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre thèse.

Hommages respectueux.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR SAURAT

de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a conseillé et encouragé dans la réalisation de cette thèse.

Témoignage de notre profonde amitié.

MONSIEUR LE PROFESSEUR PUGET

de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur et l'amitié de participer à notre Jury.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0096

INTRODUCTION

La technique des anticorps fluorescents est un procédé relativement nouveau de coloration qui a fait l'objet de nombreux travaux depuis sa création par COONS.

Il semble qu'elle puisse être considérée comme un excellent moyen de travail ouvrant de nouvelles voies à la recherche.

L'immunofluorescence a déjà dépassé le stade du laboratoire pour entrer dans le domaine du diagnostic clinique. En médecine humaine et vétérinaire les essais d'applications pratiques se multiplient principalement chez les auteurs anglo-saxons.

C'est une technique simple, efficace et surtout très rapide d'identification bactérienne en particulier qui mériterait une plus large diffusion car elle pourrait permettre, en raison même de sa rapidité, de prendre des mesures thérapeutiques et sanitaires précoces.

Cependant, en dépit de sa facilité relative, elle présente encore un certain nombre de difficultés, malgré les modifications et améliorations qui lui ont été apportées depuis sa création. Ce travail a été conçu pour tenter d'en simplifier l'emploi en précisant des points délicats, cause possible de bon nombre d'erreurs ; celui de

l'estimation du pouvoir colorant, autrement dit de l'étalonnage des sérums fluorescents.

Dans une première partie nous exposerons les bases physico-chimiques de l'immuno-fluorescence, sa technique et ses possibilités qui sont très vastes en nous attachant, plus particulièrement, au domaine de la bactériologie.

Dans une deuxième partie, nous traiterons de l'étalonnage des sérums marqués. Après avoir décrit le marquage des sérums que nous avons utilisés, nous étudierons leur étalonnage proprement dit, c'est-à-dire les différents facteurs influençant leur pouvoir colorant : durée de coloration, de lavage, taux de dilution et spécificité.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

PRINCIPE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE

La technique des colorations par immunofluorescence, nouvelle et originale dans sa conception et ses moyens, repose en fait sur le principe bien connu de la réaction antigène-anticorps.

La nécessité d'une identification précise, spécifique d'agents microbiens ou de virus a depuis fort longtemps conduit à utiliser cette réaction immuno-chimique comme moyen efficace de diagnostic. Qu'il suffise de rappeler les réactions d'agglutination, précipitation ou déviation du complément. Toutes ces techniques, confirmées par un long usage, se sont révélées particulièrement précieuses mais d'un emploi encore limité en raison des quantités relativement importantes des réactifs nécessaires ; d'où impossibilité de leur utilisation lorsqu'on ne dispose que d'échantillons de faible importance : coupes tissulaires ou frottis par exemple.

A cette échelle, la réaction anticorps-antigène a bien lieu mais n'est pas décelable. L'immunofluorescence est parvenue à « visualiser » ces micro-réactions. Les recherches de COONS (35) ont donné à ce problème une solution

originale, « lumineuse » pourrait-on dire, qui a pour base la fixation sur les anticorps d'une substance fluorescente rendant visible sélectivement, sous certaines conditions d'éclairage, le complexe anticorps-antigène.

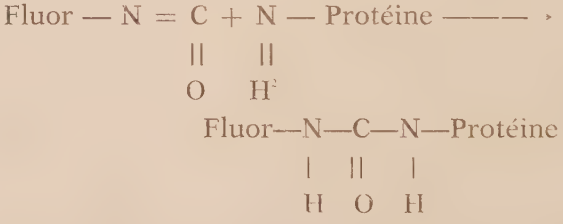
Cette fixation constitue la phase essentielle des techniques d'immunofluorescence.

1° Obtention des anticorps marqués.

Comment peut se réaliser ce marquage de la molécule protéique sans en altérer les propriétés physiques, chimiques et immunologiques ?

Les travaux originaux de Hopkins et Wormall repris et complétés par Creech et Jones (41) ont montré que la conjugaison d'une protéine avec certains hydrocarbones aromatiques, en particulier avec l'isocyanate était possible, par l'intermédiaire d'une liaison carbamide. Les caractéristiques des protéines ainsi traitées ne se trouvent pas modifiées dans leurs principes essentiels.

Partant de ces travaux, la synthèse d'un isocyanate dérivé de la fluorescéine a été réalisé (153), corps qui réagit également avec le groupe amine libre des protéines.



Par la suite plusieurs autres dérivés de la fluorescence ou d'autres substances ont été mis au point dont la fixation sur les protéines repose sur le même principe. Ces différents produits de synthèse ont donné des résultats plus ou moins satisfaisants. Ils seront étudiés dans un chapitre ultérieur.

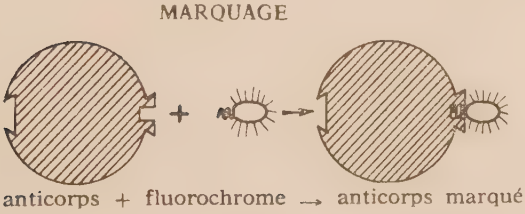
2° Emploi des sérums marqués.

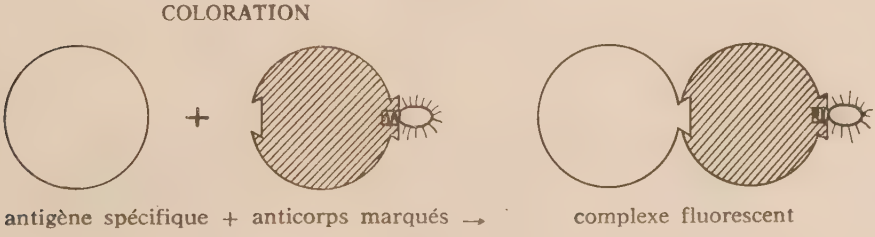
Ces anticorps marqués vont servir à rendre visible la réaction anticorps-antigène. Cette « coloration » peut se réaliser de plusieurs façons.

Coloration directe :

Elle constitue la technique originale de Coons (32). L'antigène étudié, après fixation, est mis en contact avec le sérum marqué durant un temps déterminé pour permettre, s'il y a lieu, à la réaction de se produire. Après lavage pour éliminer le sérum non fixé, la lame est examinée au microscope sous lumière ultra violette. S'il y a eu formation du complexe anticorps-antigène apparaissent des ilôts fluorescents. Dans le cas contraire le champ demeure obscur.

Cette coloration peut se schématiser ainsi :





Coloration indirecte :

L'antigène étudié est traité par son immunsérum correspondant non marqué (178). Le complexe qui en résulte, non visible, est rendu apparent par contact avec

un sérum marqué antiglobulines, spécifique des globulines du sérum non marqué utilisé dans le premier temps de la coloration et qui vient s'y fixer.

Donnons un exemple. Un frottis de P. PESTIS est mis en contact avec un sérum cheval antipesteux normal puis, dans un deuxième temps, avec un sérum fluorescent anticheval qui vient se combiner aux globulines cheval du sérum antipesteux fixé par les P. PESTIS les rendant du même coup fluorescentes.

Ce qui schématiquement peut se représenter :

MARQUAGE DE
SERUM ANTIGLOBULINE

S. antiglobuline + fluorochrome → S. antiglobuline marqué

PREMIER TEMPS
DE LA COLORATION

DEUXIEME TEMPS
DE LA COLORATION

Les avantages de cette réaction indirecte, dite aussi en « sandwich » sont de deux ordres. Elle est plus sensible mais surtout elle n'entraîne le marquage que d'un

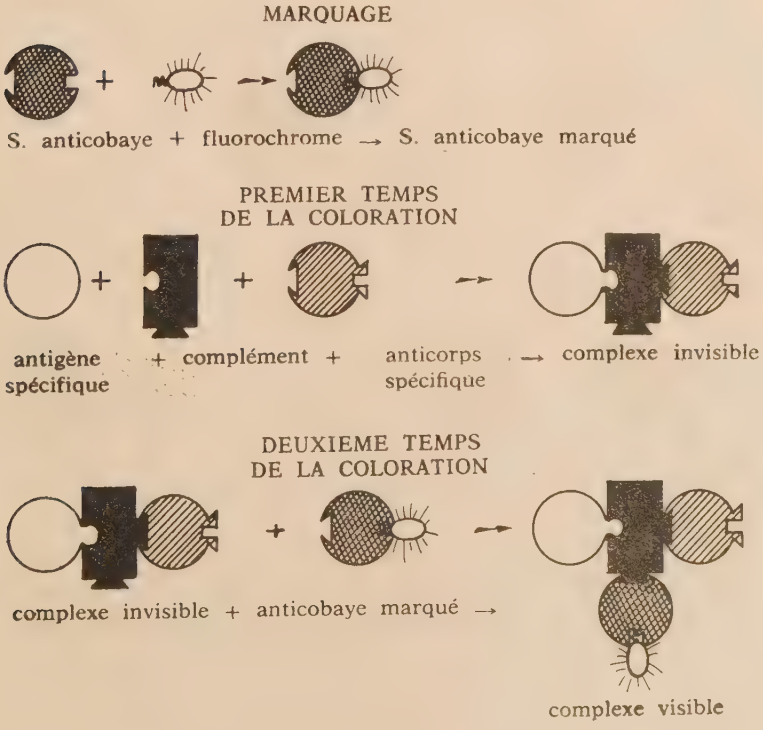
nombre réduit de sérums antiglobulines permettant la détection d'antigènes multiples. De tels sérums sont déjà commercialisés aux Etats-Unis, ce qui peut éviter les difficultés et pertes de temps du marquage.

Coloration par anticomplément marqué :

Cette technique a été mise au point par GOLDWASSER et SHEPARD (83) puis étudiée par BURKHOLDER et KLEIN (112). Elle repose sur le rôle du complément dans les réactions anticorps-antigène. Détruit par la chaleur, on le remplace par du sérum de cobaye qui en est riche.

Il suffit alors d'avoir à sa disposition un sérum antiglobulines de cobaye marqué. Dans un premier temps les frottis sont recouverts d'un mélange de sérum spécifique non marqué et de complément. Le complexe qui se forme, non visible, est rendu fluorescent en traitant, dans un deuxième temps, le frottis par un sérum anticobaye marqué.

Ce qui schématiquement peut se représenter :



Cette technique serait d'après ses auteurs encore plus sensible que la coloration indirecte et n'exige que le marquage d'un seul sérum.

3° Spécificité de l'immunofluorescence.

Les immunsérums marqués ne peuvent être utilisés sous leur forme brute, c'est-à-dire tels qu'ils résultent du couplage fluorochrome-molécule de protéine. Leur spécificité est alors médiocre et ils sont susceptible de colorer des antigènes hétérologues. Pour parer à cet inconvénient majeur il est nécessaire de les purifier.

Les travaux de Curtain (45) sur l'électrophorèse des sérums marqués ont permis de constater que toutes les albumines, qu'elles soient actives ou inertes fixent les fluorochromes. Il faut donc éliminer, avant marquage, le maximum des protéines inactives ce qui peut être obtenu par élimination des sérums-albumines.

D'autre part les fluorochromes ne doivent être couplés aux protéines qu'en proportions bien définies : un excès augmentant les risques de colorations non spécifiques, un défaut entraînant un abaissement rapide de l'intensité de la fluorescence. Coons et ses collaborateurs (36, 37) ont déterminé qu'il fallait 5 mg de fluorochrome (isocyanate) pour marquer 100 mg de globuline dans les meilleures conditions.

Enfin, ayant constaté que certains tissus organiques sont susceptibles de fixer la fluorescence non spécifique, Coons, Leduc et Conolly (38) absorbent les sérums, une fois marqués sur poudre tissulaire desséchée qui retient la plus grande partie de la fluorescence résiduelle non fixée.

4° Controle des résultats.

Comme pour toutes réactions sérologiques il est

nécessaire de soumettre les résultats obtenus à certains contrôles. Il importe de :

a) Vérifier en premier lieu que la nature de la fluorescence observée est bien liée à une réaction immunologique. Ce qui peut être réalisé par absorption du sérum marqué à l'aide d'antigènes homologues et hétérologues. Le sérum ne donnera plus de fluorescence dans le premier cas alors qu'il en donnera dans le second. Cette vérification peut être obtenue également par l'emploi d'un sérum spécifique non marqué. L'antigène saturé dans un premier temps par le sérum non marqué ne sera pas rendu fluorescent par le même sérum marqué.

b) Démontrer la spécificité de la réaction afin d'éviter tout risque de réactions croisées. Pour cela il est nécessaire de tester les sérums avec plusieurs antigènes voisins.

c) Confirmer enfin, autant qu'il est possible, les résultats à l'aide d'autres réactions sérologiques classiques.

Chapitre II

TECHNIQUE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE

Après cet exposé des bases de l'immunofluorescence, nous allons décrire les techniques de préparation des sérums et de coloration proprement dite.

1° Préparation des antisérums.

Il est essentiel que les sérums destinés au marquage soient d'une extrême pureté et d'un titre élevé, ce qui est évident si l'on pense au nombre élevé de manipulations que vont subir ces sérums d'où perte inévitable d'anticorps.

L'obtention de tels sérums peut être facilitée par l'emploi d'adjuvants, d'alun pour Proom (151), d'une émulsion huileuse pour les protéines solubles selon Davenport et Adler (48).

La pureté des anticorps semble dépendre tout particulièrement du stimulus initial. Kabat et Meyer (101) estiment que la première inoculation, qu'il s'agisse de germes ou de protéines, doit être d'une extrême pureté. Les injections suivantes ne présentent qu'une moindre importance.

Le choix de l'animal producteur dépend de chaque cas particulier. De bons résultats ont été obtenus aussi bien sur lapin, mouton, chien que cheval.

2° Concentration des sérums.

Afin de retirer des sérums la majeure partie des protéines inactives, on élimine en premier lieu la sérum-albumine Coons (36) procéde par précipitation au sulfate d'ammonium. Un volume déterminé de sérum est dilué dans un volume égal d'eau physiologique à 0,15 M de NaCl. Cette dilution refroidie à 0° + 4° C est additionnée d'une quantité égale de solution saturée de sulfate d'ammonium à + 4° C. Le mélange se fait goutte à goutte sous agitation continue.

Le précipité formé, récupéré par centrifugation à froid est lavé dans une solution à demi-saturation de sulfate d'ammonium à + 4° C. Nouvelle centrifugation à froid. Après avoir éliminé au maximum le liquide surnageant, le précipité est dissout dans un volume d'eau physiologique tamponnée phosphatée pH 7,2 (phosphate neutre de potassium 1,74 gr/1) égal au tiers du volume initial de sérum utilisé.

La solution de globulines ainsi obtenue est dialysée contre de l'eau physiologique tamponnée phosphatée pH 7,2 jusqu'à élimination totale des ions ammonium : durée de la dialyse 3 jours en moyenne, avec changement d'eau toutes les 24 heures.

Ce sérum, plus exactement cette solution de globulines est merthiolatée à 1 pour 10.000 avant d'être stockée à + 4° C.

Sa teneur en protéine doit être déterminée avec précision. La technique de Koch et Mc Meckin (114) donne d'excellents résultats et ne nécessite qu'une faible quantité de sérum.

Il existe d'autres techniques de concentration : sulfate d'ammonium à 23 % pour HOBSON (80) et précipitation alcoolique pour COHN (27) mais celle de COONS est la plus fréquemment utilisée.

3° MARQUAGE DES SÉRUMS.

Avant de décrire les différentes techniques de marquage, nous allons donner un bref inventaire des principaux fluorochromes utilisés avec succès ou ayant fourni des résultats encourageants.

Les plus connus sont les dérivés de la fluorescéine. L'isocyanate fut le premier employé par COONS (30). Il émet une fluorescence jaune verdâtre d'une bonne intensité. Malheureusement, peu stable, sa conservation est brève et limitée. L'isothiocyanate de fluorescéine a été synthétisé par RIGGS (153). Il permet d'excellentes colorations spécifiques d'une coloration jaune verdâtre. MARSCHALL et EVELAND (129) lui reconnaissent une grande sensibilité. Il est d'une stabilité parfaite à l'état solide ce qui lui confère une excellente conservation aux conditions normales. Beaucoup plus soluble que l'isocyanate, il peut se fixer aux protéines sans l'intermédiaire de solvants organiques. Cette fixation est beaucoup plus rapide : 8 heures au lieu de 18 pour l'isocyanate. C'est actuellement le fluorochrome le plus utilisé. Les dérivés de la rhodamine occupent la deuxième place des fluorochromes actuels, qu'il s'agisse de la Lissamine Rhodamine B 200 étudiée par CHADWICK (21), de l'isothiocyanate de rhodamine de RIGGS (153) ou de la tétraméthyl Rhodamine de HIRAMOTO, ENGEL et PREISSMAN (92). Ces fluorochromes solubles en solution aqueuse sont aisément fixés aux globulines. Ils émettent une fluorescence rouge orangée assez intense qui leur permet d'être employés en association avec les dérivés de la fluorescéine.

Il serait fastidieux d'énumérer tous les autres fluorochromes, nous ne citerons que ceux qui ont fait l'objet de travaux encourageants : l'acide I dimethylaminonaphtaleine 5 sulfonique qui donne une coloration jaune, CLAYON, MAYERSBACK ; l'aminorosamine et ses dérivés isocyanate et isothiocyanate qui donne une couleur orangée ; enfin l'acide 3 hydroxypyrène — 5, 8, 10 — trisulfonique qui donne une coloration analogue à la fluorescéine, trois fois plus intense d'après UEHLEKE (169-170), résultats non encore confirmés.

Nous exposerons en détail les techniques de marquage avec les principaux de ces fluorochromes.

a) *Marquage à l'isocyanate de fluorescéine :* Technique de COONS (31) :

C'est la technique originale dont dérivent toutes les autres. L'isocyanate n'étant que peu soluble, l'emploi de solvants organiques est nécessaire. Les concentrations optima pour obtenir le meilleur rendement sont :

Globulines : concentration finale	1	%	P/P
I. 4 Dioxane : solvant	15	%	V/P
Acétone : solvant	7,5	%	V/P
Tampon carbonaté pour l'obtention d'un pH 9	15	%	V/V
Isocyanate : par mg de protéine	0,05	%	
Eau physiologique	Q S		

Si nous prenons par exemple un sérum titrant 10 % de globulines, il nous faudra les quantités suivantes :

Eau physiologique	28,45 ml
Tampon pH 9	7,5 ml
Dioxane	7,5 ml
Acétone	1,75 ml

Faire ce mélange, puis le placer dans un bécher de 250 ml plongeant dans une solution réfrigérante. Le sou-

mettre à une agitation mécanique continue. Lorsque la température atteint 0° + 4° C ajouter

Sérum ..... 2,28 ml

puis verser goutte à goutte la solution :

Isocyanate de fluorescéine .... 10 mg
Acétone ..... 2,5 ml

L'agitation se poursuit durant 18 heures. Le mélange est dialysé contre de l'eau physiologique carbonatée pH 7,2 jusqu'à disparition complète de la fluorescence non fixée.

b) *Marquage à l'isothiocyanate de fluorescéine.* Technique de COCHRANE (22) :

L'isothiocyanate très soluble dispense de l'emploi de solvants. Les concentrations optima sont :

Globulines : concentration finale ..... 1 % P/V
Tampon pH 9 ..... 15 % V/V
Isothiocyanate (mg): 1/20 de la quantité de globulines utilisée.
Eau physiologique ..... Q S

Exemple :

Soit un sérum qui titre 35 mg de globulines au millilitre et dont on veut marquer 500 mg.

Préparer le mélange :

Eau physiologique ..... 28,2 ml
Tampon pH 9 ..... 7,5 ml
Sérum ..... 14,2 ml

A ce mélange refroidi à 0° + 4° C, ajouter

Isothiocyanate ..... 25 mg

La suite des manipulations est identique à celle de la technique précédente. Durée de solubilisation et de fixation du fluorochrome 8 heures au lieu de 18 nécessaires pour l'isocyanate.

c) *Marquage à l'isothiocyanate de Rhodamine.* Technique de RIGGS (153) :

Pour 10 ml de sérum on utilisera :

Sérum	10 ml
Eau physiologique	10 ml
Tampon pH 9	2 ml
Acétone	2 ml

A ce mélange refroidi à 0° + 4° C on ajoute :

Isothiocyanate de Rhodamine (par mg de protéine)	0,05 mg
Acétone	1,5 ml

d) *Marquage au 1 diméthylamino naphtalène 2 sulfonique.* Technique de MAYERSBACH (132) :

Technique assez peu courante mais offrant une assez grande facilité d'emploi.

Globuline : concentration finale	0,5 %	P/V
Eau physiologique tamponnée pH 7,8	Q S	
Dioxane	10 %	V/V

A ce mélange refroidi à 0° + 4° C ajouter goutte à goutte :

I diméthylamino en solution acétonique à 0,5 % : 5 % de la quantité de globulines.

Le mélange se fait en trois ou quatre fois, en un laps de temps de 12 heures. Attendre 12 heures, entre 0° + 4° C que la solution s'éclaircisse. Dialyser durant 48 heures contre de l'eau physiologique pH 7.

e) *Marquage au 4' Diazonium Rosamine B.* Technique de BOREK et SILVERSTEIN (11) :

Une solution d'amino rosamine B (5,2 mg dissoute dans 0,48 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N et 0,32 ml d'eau distillée) est traitée par une solution de nitrite de

soude (1,1 mg dans 0,4 ml d'eau) puis ajoutée goutte à goutte, à froid 0° + 4° C à 1 ml de sérum. Après 12 heures d'agitation continue, à froid, le mélange est dialysé durant 4 jours contre de l'eau physiologique tamponnée pH 7,2 sous agitation, et en renouvellant l'eau de dialyse toutes les 24 heures.

4° Epuration des sérums marqués.

Pour éliminer les fluorochromes non fixés, susceptibles de donner des colorations non spécifiques on peut utiliser plusieurs procédés : adsorption sur colonne de résine, précipitation par l'alcool à froid — Cohn (27 — ou mieux par absorption sur poudre de tissu comme le préconise Coons (31). Cet auteur recommande l'emploi d'extraits secs de foie, rate et moelle osseuse de souris qui expérimentalement lui ont donné les meilleurs résultats. Une quantité donnée de tissus frais est broyée dans un volume égal d'eau physiologique à l'aide d'un broyeur pulpeur, en ayant soin d'éviter toute élévation notable de température en cours d'opération. La suspension obtenue est agitée 10 minutes dans 4 volumes d'acétone. Après centrifugation et élimination du liquide surnageant, le culot est lavé en eau physiologique, à plusieurs reprises, jusqu'à disparition de toute trace d'hémoglobine. Le culot est repris dans 4 fois son volume d'acétone. Après agitation de 15 minutes, on filtre sur Buchner. Après séchage de 12 heures à 37° C la poudre est récupérée et stockée à + 4° C. Cet extrait tissulaire sec est insoluble en eau physiologique.

Pour épurer les sérums marqués 100 mg de poudre sont nécessaires par millilitre de sérum. Le mélange après agitation manuelle est laissé une heure à température ordinaire puis centrifugé à froid, à très grande vitesse, 18.000 t/mn. La perte en sérum est de l'ordre de 30 %,

taux qui s'accroît rapidement avec une diminution de la vitesse de centrifugation.

Il est recommandé de n'épurer que la quantité de sérum immédiatement utilisable et non la totalité du stock.

Une deuxième épuration est parfois nécessaire pour certains sérums. Elle se réalise de la même façon que précédemment.

5° Technique des colorations.

La technique des immunocolorations est très simple mais elle exige des manipulations minutieuses et une propreté rigoureuse si l'on veut éviter la présence d'impuretés brillamment fluorescentes pouvant masquer les colorations spécifiques.

a) *Préparation de la verrerie :*

Toute la verrerie, qui ne présente rien de spécial dans ses qualités, en particulier lames et lamelles, doivent être d'une rigoureuse netteté. Leur dégraissage doit être total et il convient de les passer au moins deux fois à l'acétone. Une fois prêtes elles seront conservées à l'abri des poussières qui pourraient souiller leur surface.

b) *Préparation des frottis et coupes :*

Les frottis et coupes se font selon les techniques classiques. La fixation seule doit être menée avec une attention spéciale pour éviter la destruction ou la dissolution des antigènes par les fixateurs. Pratiquement la fixation varie avec chaque antigène, surtout lorsqu'il s'agit de coupe de tissus.

Pour les frottis bactériens on peut utiliser, selon les résultats fournis par quelques essais préliminaires, l'acé-

tone, l'alcool éthylique ou méthylique, le mélange alcool absolu-éther ou simplement la fixation par la chaleur.

Après fixation, les préparations sont humidifiées par passage rapide en eau tamponnée pH 7,2.

c) *Colorations :*

Peuvent être directes ou indirectes :

Coloration directe : Une goutte de sérum marqué est placée sur le frottis. Le contact est maintenu durant 20 minutes en moyenne (temps pouvant varier avec le titre et la dilution du sérum) à température ordinaire ou mieux à l'étuve à 37° C. Pour éviter l'évaporation du sérum, les lames sont mises dans une boîte de Pétri dont le fond est garni d'un papier filtre imbibé d'eau. Les lames sont ensuite lavées avec grand soin, c'est là le temps essentiel, par trempage en eau tamponnée phosphatée pH 7,2 durant des temps variant de 10 à 20 minutes selon les auteurs, en ayant soin de renouveller trois fois l'eau de lavage. Une fois lavées, les lames sont égouttées puis montées en glycérine tamponnée pH 8 pour les colorants dérivés de la fluorescéine, pH 7,2 pour les dérivés de la rhodamine (22).

Leur lecture doit s'effectuer le plus rapidement possible, la fluorescence décroissant assez vite.

Coloration indirecte : Une goutte de sérum spécifique non marqué est placée sur le frottis. On laisse agir durant 20 minutes à température normale ou à 37° C en atmosphère humide. Puis les lames sont lavées en eau tamponnée phosphatée pH 7,2 durant 10 minutes en renouvelant trois fois l'eau de lavage. Egouttés, mais non séchés, les frottis sont traités par le sérum antiglobuline marqué spécifique dans les conditions de la coloration directe.

d) *Epreuves de contrôle :*

La spécificité des colorations peut être contrôlée par les deux procédés suivants :

— Contrôle à l'aide d'un sérum marqué normal :

Deux frottis sont traités l'un avec le sérum marqué spécifique, l'autre avec un sérum normal marqué. Si le premier frottis est fluorescent et non le second, la coloration est spécifique ; si les deux frottis sont fluorescents il n'y a pas spécificité.

— Contrôle par blocage à l'aide d'un sérum spécifique non marqué :

Un frottis est traité avec un sérum spécifique non marqué. Les anticorps se fixent sur l'antigène. Dans un deuxième temps on colore avec le sérum spécifique marqué. Les antigènes ayant été saturés par les anticorps non marqués, il ne peut y avoir fixation des anticorps fluorescents : donc absence de fluorescence.

6° Matériel optique.

Tous les microscopes de laboratoire peuvent convenir à la lecture des immunocolorations. Toutefois des monoculaires sont préférables en raison des pertes de lumière moins considérables.

Ces microscopes doivent être équipés d'objectifs achromatiques ou apochromatiques si l'on n'utilise pas de condensateur à fond noir. Les miroirs plans sont de préférence alumisés.

Les oculaires 10 X doivent être équipés de filtres d'arrêt, barrière pour les longueurs d'onde inférieures à 4.200 Å, arrêtant les U.V. et laissant passer la lumière fluorescente (Wratten 2 A ou 2 B - Kodak C O 2 A - Zeiss U G 2). Les filtres oculaires de faible coloration sont à préférer aux filtres jaunes, surtout lorsqu'on exa-

mine des fluorescences de teinte jaune et de faible intensité qui risquent alors d'être pratiquement indécelables.

La source lumineuse est constituée par une lampe à vapeur de mercure car une lumière ultra-violette de grande puissance est nécessaire (Lampe type Osram H.B.O. 200 ou General Electric A.H. 6). Elle est équipée d'un filtre excitateur qui élimine les longueurs d'onde de la lumière visible (Corning C.S. 5.58 ou Zeiss U.G. 2). Afin d'éviter que la chaleur ne brise le filtre excitateur il faut avoir soin d'intercaler un filtre anticalorique.

Des photographies peuvent être prises avec les appareils ordinaires utilisant des films en noir ou en couleur. Les temps de pose ne peuvent être fixés qu'après étalonnage du système optique.

Chapitre III

POSSIBILITE DES IMMUNOCOLORATIONS

L'immunofluorescence peut s'appliquer à l'étude de questions très variées. Le nombre important de publications traitant de ses possibilités en témoigne. Il serait fastidieux de les mentionner d'une façon détaillée. La bibliographie qui termine ce travail permettra de s'y rapporter.

Schématiquement les principaux sujets qui ont été abordés peuvent se grouper sous trois rubriques.

1° Etude de la synthèse des anticorps et des réactions qu'ils suscitent in vivo.

Le devenir des antigènes injectés in vivo a été étudié grâce à l'immunofluorescence par Coons (28). Elle lui a permis de situer avec précision leurs points de fixation. Grâce à la technique de coloration indirecte il a pu déterminer par la suite les lieux de synthèse des anticorps (33), travaux poursuivis et complétés par de nombreux auteurs (2-33-38-142-146-149-181-187). Les immunocolorations ont permis également l'étude des protéines participant à certaines maladies cliniques ou expérimen-

tales ainsi que celles du mécanisme des réactions d'hypersensibilité dues aux anticorps circulant in vivo (4-23-52-72-128-134-146-157). Par exemple Gamuto (72) et Cochrane (23) ont pu montrer que dans les phénomènes d'Arthus, l'antigène et l'anticorps se localisent dans la paroi des vaisseaux qui en sont lésés sélectivement.

2° Etude des antigènes tissulaires.

Il existe là un vaste champ d'application pour les techniques d'immunofluorescence. De très nombreuses recherches ont été effectuées sur les hormones et la myosine par exemple (43-62-63-98-115-130-168), travaux de Marschall sur l'hypophyse complétés par ceux de Cruicksham et Curri.

En hématologie (1-25-75-159-180) ces techniques ont permis à Glyn, Holborow et Johnson entre autres, d'étudier les différents antigènes des groupes sanguins. Szulman a mis en évidence la distribution des antigènes des groupes A et B dans l'organisme.

Une étude très poussée des maladies par auto-immunisation a été faite, concernant en particulier la thyroïdite chronique (6-7-92-95-185).

3° Etude des micro-organismes.

En bactériologie et virologie les colorations fluorescentes ont été largement utilisées dans les domaines du diagnostic et de l'expérimentation. Elle a la valeur d'un véritable test sérologique dont elle possède les caractéristiques : spécificité et sensibilité.

Spécificité car elle peut être contrôlée par des réactions croisées et confirmée par tous les autres procédés de culture et d'isolement. Le plus souvent sa spécificité correspond à celle des techniques sérologiques classi-

ques. Ainsi lorsqu'un sérum antibactérien réagit sérologiquement avec un type voisin on retrouve également une image fluorescente des deux types, fluorescence non spécifique qui peut être éliminée par absorption avec le germe qui donne cette réaction croisée. Spécificité mise en évidence par WHITAKER (180) qui, étudiant l'entérite colibacillaire, montre que l'immunsérum préparé contre un type de coli donne uniquement des colorations avec ce type et jamais avec six autres pris comme témoins.

Sa sensibilité (qui par définition est la capacité pour une méthode sérologique de détecter des anticorps à des taux de dilution très élevés), se révèle d'après BEUTNER (8) égale à celle de la déviation du complément, plus élevée que celle des réactions de précipitation, sensiblement inférieure aux tests d'agglutination. C'est ainsi qu'elle peut permettre la mise en évidence d'un nombre très limité de germes. 100 au millilitre au lieu de 10^6 par l'agglutination d'après MOODY (138) et THOMASSON (167). Ces qualités de sensibilité et de spécificité expliquent son emploi en tant que moyen de diagnostic dans certains cas, comme le fait DEACON (49), pour des germes ne pouvant cultiver sur milieux artificiels ou dont l'isolement est rendu difficile par l'administration au malade d'antibiotiques : Coli pathogènes, WHITAKER (180), Streptocoques CARTER (17). D'où son utilisation dans le repérage des germes multiformes dans un mélange de micro organismes morphologiquement voisins. Dans la majorité des cas les résultats obtenus ont été superposables à ceux fournis par les moyens classiques.

KABANOVA et GLUBONIKA (100) ont détecté des Shigella Flexneri par immunofluorescence avec une précision sensiblement égale à celle des agglutinations. Résultats analogues pour DACRES et GROTH avec Erysipelothrix rhusiopathiae (46).

Avec Treponema pallidum la méthode se révèle supérieure à tous les tests utilisant des antigènes non spécifiques (18-49). Dans ce cas particulier sa valeur est au moins égale à celle de la déviation du complément et exige moins de réactifs. Pour Olansky et Mc Connor (147), Borel et Durel (10) elle semble devoir devenir la méthode de diagnostic de choix (20-135-161-172). Le domaine de la cytologie bactérienne est ouvert également aux techniques d'immunofluorescence. Thomasson, Cherry et Moody (166) ont précisé trois des localisations antigéniques des différents antigènes de Salmonella Typhi. Localisation également de l'antigène protecteur d'Hemophilus pertussis par de Repentigny (51).

Enfin les immunocolorations donnent de nouveaux moyens à l'étude du devenir des antigènes bactériens après injection. Ainsi pour le Streptocoque Hémolytique Schmidt (156-157) montre la présence plus ou moins durable, dans les tissus, des antigènes, présence qui varie de quelques minutes à quelques jours selon la nature de l'antigène considéré.

Emmart (58) a étudié le devenir de la hyaluronidase streptoccocique après injection à la souris et Cremer (42) l'influence des facteurs modifiant l'élimination de l'endotoxine de Salmonella Typhosa.

En ce qui concerne la virologie, des résultats satisfaisants ont été obtenus aussi bien dans le domaine de la caractérisation de l'agent viral (16-25-60) que dans celui de leur localisation intracellulaire (3-12-15-13-117-143-144) et celui de l'étude précise des inter réactions virus-cellule hôte (9-90-118-122-152-174-14).

DEUXIEME PARTIE

A l'inverse des colorants chimiques, qui sont d'une composition déterminée et constante, les immunsérums fluorescents ne présentent aucun de ces caractères. Chacun d'eux pose un problème particulier. Sa spécificité n'est pas connue, son pouvoir colorant indéterminé. Dans ces conditions, il serait pour le moins risqué de les utiliser et surtout de conclure à partir des résultats obtenus, sans les avoir étalonnés au préalable.

Les techniques de colorations décrites dans la première partie de ce travail, valables dans leur ensemble ont à subir quelques variantes, qui pour n'être que légères, n'en influent pas moins sur le rendement de cette méthode.

Il est évident qu'un sérum marqué à fort pouvoir fluorescent n'exigera pas le même temps de coloration ou de lavage qu'un sérum faible. De même il ne faut pas oublier que cette technique, basée sur une réaction immunologique, peut être soumise à des phénomènes de zone et que de ce fait les meilleurs résultats ne sont pas obtenus avec les plus fortes concentrations d'anticorps.

Ces raisons expliquent les variantes que l'on rencontre d'un auteur à l'autre. Notre but est d'essayer de mettre en évidence les causes de ces variations, de les codifier et en quelque sorte de normaliser l'étalonnage

de ces sérums marqués, ce qui pourrait éviter à d'éventuels utilisateurs les écueils qui nous ont fait longtemps tâtonner avant de pouvoir employer correctement cette technique. Pour cela, après avoir choisi un germe, présentant certains avantages morphologiques, nous avons préparé, à l'aide de plusieurs fluorochromes, un immusérum spécifique à ce germe et un sérum antiglobuline correspondant. Ces sérums marqués ont été essayés en coloration directe et indirecte pour déterminer les conditions optima d'emploi de chacun d'eux.

CHAPITRE PREMIER

PREPARATION DES REACTIFS

1° CHOIX DU GERME.

Notre choix s'est porté sur le bacille du charbon, Bacteridium Anthracis, germe d'une taille importante, donc d'une « visualisation » plus facile en fluorescence. Sa culture est rapide et facile en milieux usuels. Nous avons utilisé une des souches atténuées à la chaleur destinées à la vaccination selon la méthode Pastorienne, de manipulation plus facile tout en ayant conservé sa virulence pour la souris.

2° SÉRUMS UTILISÉS.

Le sérum antibactérien utilisé est le sérum anticharbonneux de l'Institut Pasteur : immusérum commercial de haut titre et à propriété anti bactérienne très nette. Quant au sérum antiglobuline, étant donné que notre sérum anticharbonneux était d'origine équine, nous avons préparé un sérum lapin antiglobulines cheval. La technique utilisée a été la suivante : injections intraveineuses au lapin de 5 ml de sérum cheval tous les 2 jours. Après la sixième injection, le titre déterminé par précipitation, a été de 1/128^{e}. Le sérum récolté a été stocké à —10° C.

3° Fluorochromes choisis.

Deux fluorochromes ont été utilisés : l'isothiocyanate de fluorescéine et l'isothiocyanate de Rhodamine. Les raisons de ce choix sont de trois ordres. Ce sont les fluorochromes les plus fréquemment employés, leurs conditions d'utilisation sont bien définies, leur fixation relativement rapide. Ils donnent une excellente fluorescence, très brillante dans deux tons différents. Leur stabilité chimique leur confère une conservation facile et prolongée. Enfin parce qu'il est relativement facile de se les procurer grâce à la commercialisation courante aux Etats-Unis (Baltimore Biological Laboratory).

4° Epuration des sérums.

L'élimination de la fraction inactive des protéines a été réalisée selon la technique de Coons par précipitation des sérums-globulines au sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Le processus a été le suivant :

a) *Sérum antiglobulines cheval :*

Onze millilitres de sérum ont été dilués dans 11 ml d'eau physiologique. A froid sous agitation mécanique continue ont été ajoutés 22 ml d'une solution à saturation de sulfate d'ammonium. La précipitation des globulines débute immédiatement et se poursuit durant 6 heures. La suspension est centrifugée à froid, 15 minutes à 3 500 t/m. Le culot est lavé dans une solution demi saturée de sulfate d'ammonium puis centrifugé, à deux reprises. Le culot obtenu est repris finalement en eau physiologique tamponnée pH 7,2 dans un volume égal au tiers du volume initial de sérum soit 4 ml.

Le sérum obtenu est dialysé contre de l'eau physio-

logique tamponnée pH 7,2 durant 4 jours, disparition totale des ions ammonium vérifiée au réactif de NESSLER.

b) *Sérum anticharbonneux :*

Même technique. Volume initial 30 ml. Volume de la solution finale de globulines 10 ml. Durée de dialyse 5 jours.

5° TITRAGE DE LA TENEUR EN GLOBULINES.

Un dixième de millilitre de sérum est prélevé rigoureusement à l'aide d'une pipette à deux traits et dilué dans 5 ml d'eau physiologique ; dilution obtenue 1/51e. Le titrage s'opère sur 0,5 ml de cette dilution par microdosage Kjeldahl de l'azote. La conversion en protéines se calcule suivant le rapport

N/protéine = 6,25.

Les résultats obtenus ont été :

a) *Sérum lapin anti globulines cheval :*

N^2 dans 0,5 ml de solution diluée de globulines : 0,11 mg.

N^2 dans 1 ml de sérum $0,11 \times 2 \times 51 \rightarrow 11,22$ mg.

Teneur en globulines dans 1 ml de sérum anti cheval $11,22 \times 6,25 = 70,12$ mg/ml.

b) *Sérum anticharbonneux :*

N^2 dans 0,5 ml de solution diluée de globulines : 0,13 mg.

N^2 dans 1 ml de sérum $0,13 \times 2 \times 51 \rightarrow 13,26$ mg.

Teneur en globulines dans 1 ml de sérum anticharbonneux : $13,26 \times 6,25 = 82,87$ mg/ml.

6° MARQUAGE DES SÉRUMS.

Le marquage des sérums a été réalisé selon la méthode de COCHRANE (22) que nous avons choisie pour sa

simplicité et en raison des bons résultats obtenus au cours d'essais préliminaires. Elle offre, en outre, l'avantage de ne pas faire appel aux solvants organiques, difficiles à se procurer très purs (ce qui est indispensable).

Nous n'exposerons pas les détails de cette technique qui a été étudiée précédemment, seules sont données les quantités de réactifs utilisés.

a) *Sérum lapin antiglobulines de cheval :*

Tampon carbonaté pH 9	7,5 ml	soit 15 % V/V
Eau physiologique (pour avoir une concentration au 1/100 de globulines)	35,36 ml	
Sérum anticheval	7,14 ml	soit 500 mg globulines
Total	50 ml	
Isothiocyanate de fluorescéine ou Isothiocyanate de Rhodamine		25 mg

b) *Sérum anticharbonneux :*

Tampon carbonaté pH 9	7,5 ml	
Eau physiologique	34,48 ml	
Sérum anticharbonneux	6,02 ml	
Isothiocyanate de fluorescéine ou Isothiocyanate de Rhodamine		25 mg

La mise en solution de la rhodamine est sensiblement plus longue que pour la fluorescéine. Elle demandera 48 heures au lieu de 18 heures.

La dialyse pour être totale a été de 4 jours pour les deux sérums marqués à l'isothiocyanate de rhodamine et de 10 jours pour ceux marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine.

7° Purification des sérums marqués.

L'élimination de la fluorescence non spécifique a été obtenue par passage sur poudre de tissu selon la technique de Coons. Cet extrait tissulaire a été préparé à partir de foies et rates de souris. A ce sujet, il convient de rappeler la nécessité d'une élimination totale de l'hémoglobine si l'on veut obtenir un produit parfaitement pulvérulent, sinon il demeure grumeleux et pratiquement inutilisable.

Il est mélangé 100 mg de poudre tissulaire par millilitre de sérum marqué. La séparation est faite par centrifugation à 3 700 t/mn avec un rendement de 75 %. Après une deuxième épuration il tombe à 55 %.

Pour limiter des pertes de cette importance, nous avons remplacé la centrifugation par une filtration sur membrane cellulosique, type Millipore (diamètre des pores 0,8 µ). Le rendement s'est révélé supérieur à 90 %. Mais cette filtration est lente, 1 heure pour 2 ml de sérum, sous dépression et avec 3 changements de membranes, celles-ci se colmatant rapidement. Les sérums filtrés ne sont pas altérés et se sont révélés de valeur égale à ceux préparés par centrifugation.

8° Vérification du titre des sérums après marquage.

Il est nécessaire, chaque fois que cela est possible, de vérifier le titre des sérums après marquage. Leur teneur en anticorps peut être tombée d'une manière trop importante pour qu'ils puissent être encore utilisés. Il est logique d'envisager cette éventualité étant donné le nombre de manipulations subies par les globulines.

Nous n'avons titré que le sérum lapin antiglobulines cheval dont le titre était connu au départ.

Les résultats ont été :

SERUM	TITRE PRECIPITANT							
	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
avant marquage	+	+	+	+	+	+	+	-
après marquage	+	+	+	+	+	+	+	0

Soit une perte de titre de 50 % environ d'où la nécessité de n'utiliser que des sérums très riches en anticorps au départ.

Chapitre II

ETALONNAGE DES SERUMS MARQUES

Ce chapitre est consacré à l'étalonnage proprement dit des sérums fluorescents. Il nous faudra distinguer d'une part, les sérums antimicrobiens destinés aux colorations directes, d'autre part les sérums antiglobulines utilisés en colorations indirectes. Dans chacun de ces deux groupes les quatre facteurs dont dépend la qualité des colorations, à savoir :

Durée du temps de coloration,
Durée du temps de lavage,
Taux de dilution des sérums,
Spécificité,

seront étudiés séparément. Pour cela nous ferons varier successivement chacun de ces facteurs, les trois autres demeurant fixes.

Précisons immédiatement que l'antigène sera constant tout au cours de cette étude. Il sera constitué de cultures, de 24 heures, sur gélose ordinaire de B. Anthracis. Une öse de ces cultures est diluée dans 5 ml d'eau physiologique. Des suspensions plus denses peuvent gêner la lecture des résultats. Les germes ayant tendance à s'agglutiner, il se forme des amas, colorés d'une manière diffuse, souvent difficiles à différencier des impuretés

fluorescentes assez fréquentes lorsqu'on ne possède pas une certaine expérience de cette technique. Les étalements une fois secs, sont fixés à la chaleur : trois passages rapides dans la flamme d'un bec Bunsen, fixation qui nous a donné les meilleurs résultats.

A. — ETALONNAGE DES SERUMS ANTIBACTERIENS MARQUES

Cet étalonnage se réalise à l'aide de la coloration directe, ce qui va être fait pour nos sérums marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine et de rhodamine.

1° Durée de coloration.

Les sérums seront utilisés purs. La durée de lavage est fixée à priori à 20 minutes, temps le plus fréquemment employé par les auteurs.

La durée de contact entre l'antigène et l'anticorps marqué passera progressivement de 5 à 30 minutes. La lecture des colorations aura lieu 5 minutes après le montage des lames. Grossissement employé × 120 et × 1 000. Les résultats ont été les suivants.

a) *Sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.* Tableau I.

5 à 10 minutes de coloration ne donnent pas de fluorescence si ce n'est quelques traces ininterprétables (cas douteux). Pour 15 minutes : fluorescence nette des germes et de leurs agglomérats, bien visibles à faible grossissement, déjà apparents avec l'objectif à immersion. Après 20 minutes : très bonne fluorescence. Les B. Anthracis tranchent très nettement en jaune verdâtre sur le fond noir du frottis. La mise au point est facile à fort

grossissement. Aucun cas douteux sur 10 essais. Au-delà de 20 minutes les résultats sont superposables.

TABLEAU I

Durée de coloration avec un sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine

Numéro de l'essai	Durée de coloration					
	5' (1)	10'	15'	20'	25'	30'
1	0	0	+	+	±	± +
2	0	0	+	++	++	++ ±
3	0	±	±	+±	+ ±	+++
4	0	0	+	++	+ ±	±±±
5	0	0	+	++	++	+++
6	±	±	+	++	++	+++
7	0	0	+	++	++	+++
8	0	0	+	++	++	+++
9	0	0	+	++	++	+++
10	0	0	±	++	++	+++

(1) 0 = Absence de fluorescence
± = Réaction douteuse
\+ = Coloration faible
++ = Bonne coloration
+++ = Très forte fluorescence

On peut donc conclure que le temps minimum de coloration effective pour ce sérum est de 20 minutes.

Il y a intérêt en effet à adopter ce temps et non pas des durées supérieures, qui en raison même de leur grande intensité de coloration risquent de provoquer des surcoloration et des fluorescences non spécifiques qu'un accroissement du temps de lavage ne parviendra pas à éliminer.

b) *Sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de rhodamine.* Tableau II.

Pour des durées de coloration inférieures ou égales à 15 minutes : pas de coloration ou simples traces (réactions douteuses 3 cas sur 30 essais).

A partir de 20 minutes de contact, les germes apparaissent fluorescents à faible grossissement ; non visibles à fort grossissement.

A partir de 25 minutes les colorations sont excellentes : bonne fluorescence jaune orangée, facilement visible, morphologie cellulaire distincte aux forts grossissements.

Pour le sérum anticharbonneux marqué à la rhodamine, la durée de coloration type est donc de 25 minutes.

TABLEAU II

Durée de coloration avec un sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de rhodamine

Numéro de l'essai	Durée de coloration					
	5'	10'	15'	20'	25'	30'
11	0	0	0	+	++	+++
12	0	0	±	+	++	+++
13	0	0	0	±	++	++
14	0	0	0	+	++	+++
15	0	0	0	+	++	+++
16	0	0	±	±	++	+++
17	0	0	0	+	++	++
18	0	0	0	±	++	+++
19	0	0	0	±	++	+++
20	0	0	±	+	++	+++

2° Temps de lavage.

Les sérums, toujours employés purs, seront utilisés dans les conditions que nous venons de déterminer, à savoir : coloration de 20 minutes pour le sérum marqué à la fluorescéine et de 25 minutes pour celui marqué à la rhodamine.

Le temps de lavage passera progressivement de 1 à 20 minutes.

Pour contrôler le degré d'élimination de la fluorescence non spécifique il est nécessaire d'avoir recours à un témoin constitué par un germe autre que B. Anthracis. Ce germe ne fixant pas les anticorps charbonneux fluorescents ne doit pas être visible après lavage. Nous avons pris comme témoin le Bacillus Pumilus. Les étalements de ce germe sont faits dans les mêmes conditions que pour B. Anthracis. Des deux microorganismes sont soumis parallèlement et de manière rigoureusement identique à l'action des immunsérums marqués. Les résultats obtenus ont été :

a) *Sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.* Tableau III.

Après lavage de 1 et 5 minutes les résultats sont inexploitables. En effet le B. Pumilus et le B. Anthracis sont tous deux visibles avec une brillance peut-être moins marquée par B. Pumilus. Mais il est impossible d'établir une identification sur cette simple variation d'intensité.

Après 10 minutes de lavage les germes témoins ont cessé d'être visibles dans 80 % des essais, mais dans les 20 % restant subsiste une fluorescence faible mais encore décelable aux faibles grossissements.

A partir de 15 minutes de lavage, seuls sont visibles les bacilles du charbon, les témoins ne présentant plus du tout de fluorescence.

TABLEAU III

Durée de lavage pour des colorations avec un sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine

Numéro des essais	Temps de lavage									
	1'		5'		10'		15'		20'	
	Tém.	B. Anthr.	T.	B.A.	T.	B.A.	T.	B.A.	T.	B.A.
21	+	++	+	++	0	++	0	++	0	++
22	+	++	+	++	±	++	0	++	0	++
23	+	++	±	++	0	++	0	++	0	++
24	+	++	±	++	0	++	0	++	0	++
25	+	++	±	++	0	++	0	++	0	++
26	+	++	+	++	±	++	0	++	0	++
27	+	+	±	++	0	++	0	+	0	++
28	+	++	±	+	0	++	0	++	0	++
29	+	++	+	++	0	++	0	++	0	++
30	+	++	±	++	0	++	0	++	0	++

Le temps de lavage minimum pour ce sérum est donc de 15 minutes.

b) *Sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de rhodamine.* Tableau IV.

En deçà de 10 minutes de lavage le témoin présente toujours des traces de fluorescence indiquant une élimination incomplète des anticorps marqués non fixés. A partir de 10 minutes seuls sont visibles les bacilles du charbon. Le temps de lavage minimum pour ce sérum est de 10 minutes.

TABLEAU IV

Temps de lavage pour des colorations avec un sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de rhodamine

Numéros des essais	Temps de lavage									
	1'		5'		10'		15'		20'	
	Tém.	B. Anthr.	T.	B.A.	T.	B.A.	T.	B.A.	T.	B.A.
31	+	++	+	++	0	++	0	++	0	+
32	+	++	±	+	0	++	0	++	0	++
33	+	++	±	++	0	++	0	++	0	++
34	+	++	±	++	0	++	0	++	0	++
35	+	+	+	++	0	+	0	++	0	++
36	+	++	0	++	0	++	0	++	0	++
37	+	++	+	++	0	++	0	++	0	++
38	+	++	±	++	0	++	0	++	0	++
39	+	++	+	++	0	++	0	++	0	++
40	+	++	±	++	0	++	0	++	0	++

3° Taux de dilution des sérums.

La majorité des auteurs emploie purs leurs immun-sérums marqués. Cependant, certains, entre autres Marschall et Eveland (190), Vozza et Paulozzi (173), les diluent chaque fois que cela est possible. Ils ont en effet constaté que ces sérums utilisés purs donnent souvent des réactions difficiles à lire. Les colorations sont alors d'une telle intensité, qu'en dépit de lavages répétés les pseudo réactions sont fréquentes et qu'il peut en outre se former un véritable hâlo de distorsion autour des germes colorés, gênant la lecture des préparations. La spéci-

ficité des sérums s'en trouve diminuée. Tous les procédés d'épuration, utilisés en cours de marquage ne parviennent à faire disparaître cette coloration. Seule la dilution des sérums au moment de leur emploi permet d'y remédier. Ce taux de dilution ne peut être déterminé à priori, il est propre à chaque sérum car il dépend de leur titre initial, de la dégradation des globulines de la nature et de la qualité des fluorochromes. Il est donc indispensable de titrer individuellement chaque sérum. La dilution convenable sera la dilution la plus élevée donnant constamment de bonnes colorations, lisibles même à fort grossissement. Tel sera le critérium de notre choix. Pour nos essais nous utiliserons les temps de coloration et de lavage déterminés précédemment ; seule variante le taux de dilution des sérums. Ces dilutions sont faites en eau physiologiques pH 7,2.

a) *Sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.* Tableau V.

Le sérum utilisé pur et au demi donne d'excellentes colorations. Au quart elles sont bonnes, encore nettement visibles à l'objectif à immersion.

Par contre à partir du 8e certaines préparations sont illisibles. Au-delà il n'y a plus de coloration. Le taux de dilution convenable pour ce sérum est donc le quart.

b) *Sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de rhodamine.* Tableau VI.

A l'inverse du sérum marqué à la fluorescéine on constate une chute rapide du pouvoir colorant dès les premières dilutions. Les colorations très bonnes avec le sérum pur sont inconstantes au demi (2 cas douteux sur 10 essais). Au quart la presque totalité des colorations sont douteuses ou négatives. Ce sérum est à utiliser pur.

TABLEAU V

Taux de dilution pour un sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine

Numéros des essais	Taux de dilution								
	P.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
41	++	++	++	+	0	0	0	0	0
42	++	++	+	±	0	0	0	0	0
43	++	++	++	+	0	0	0	0	0
44	++	++	+	±	0	0	0	0	0
45	++	++	+	±	0	0	0	0	0
46	++	++	+	±	0	0	0	0	0
47	++	++	+	±	0	0	0	0	0
48	++	++	+	+	±	0	0	0	0
49	++	++	+	±	0	0	0	0	0
50	++	++	+	±	0	0	0	0	0

4° Contrôle de la spécificité.

Connaissant les caractéristiques de ces deux sérums anticharbonneux marqués, il reste à contrôler leur spécificité. Deux contrôles distincts seront utilisés.

Le premier consiste à tester ces sérums avec d'autres germes que B. Anthracis. S'il est possible de colorer, ne serait-ce qu'un seul d'entre eux, la spécificité de nos sérums sera nulle.

Le deuxième test tendra à vérifier la nature sérologique des colorations obtenues.

TABLEAU VI

Taux de dilution pour un sérum anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de Rhodamine

Numéros des essais	Taux de dilution								
	P.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
51	++	+	0	0	0	0	0	0	0
52	++	+	0	0	0	0	0	0	0
53	++	+	±	0	0	0	0	0	0
54	++	+	±	±	0	0	0	0	0
55	++	+	0	0	0	0	0	0	0
56	++	±	0	0	0	0	0	0	0
57	++	±	0	0	0	0	0	0	0
58	++	+	±	0	0	0	0	0	0
59	++	+	±	0	0	0	0	0	0
60	++	+	±	0	0	0	0	0	0

a) *Pouvoir colorant des immunsérums charbonneux marqués vis-à-vis des germes hétérologues :*

Trois germes ont été choisis : 1 germe aérobie non sporulé : Erysipelothrix insidiora, 1 germe aérobie sporulé : Bacillus Pumilus et un anaerobie C. Botulinum. Les prélèvements sont faits à partir de cultures de 24 h. pour les deux premiers, lors de la phase logarithmique de développement pour le troisième. Les frottis sont réalisés dans les mêmes conditions que pour B. Anthracis. Colorations et lectures sont identiques pour tous.

Dans tous les essais — tableau VII — seul B. Anthra-

TABLEAU VII

Spécificité des sérums anticharbonneux marqués vis-à-vis de différents germes

Numéros des essais	Nature des Germes			
	B. Anthracis	E. Insidiosa	B. Pumilus	C. Botulinum
1° Sérum marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine				
61	++	0	0	0
62	++	0	0	0
63	++	0	0	0
64	++	0	0	0
65	++	0	0	0
2° Sérum marqué à l'isothiocyanate de rhodamine				
66	++	0	0	0
67	+	0	0	0
68	++	0	0	0
69	++	0	0	0
70	++	0	0	0

cis a été coloré, aucune coloration, même douteuse, de l'un des trois autres germes aussi bien avec le sérum marqué à la fluorescéine qu'avec celui marqué à la rhodamine.

b) *Vérification de la nature sérologique des colorations :*

Ce contrôle se réalise par blocage de la réaction. Des frottis de B. Anthracis sont traités dans un premier temps par un sérum anticharbonneux non marqué,

TABLEAU VIII

Contrôle de la nature sérologique des colorations

Numéros des essais	Sérum anticharbonneux marqué à :			
	isothiocyanate de fluorescéine		isothiocyanate de rhodamine	
	Contrôle	Témoin	Contrôle	Témoin
71	0	++	0	++
72	0	++	0	+
73	0	++	0	++
74	0	+	0	++
75	0	++	0	+
76	0	++	0	++
77	0	++	0	++
78	0	++	0	++
79	0	++	0	++
80	0	++	0	++

durant 30 minutes, puis lavés en eau physiologique tamponnée phosphatée pH 7,2, 30 minutes. Dans un deuxième temps, les préparations sont recouvertes de sérum anticharbonneux marqué suivant la technique directe. Un témoin non bloqué est coloré en même temps.

Comme dans la première phase, il y a eu « saturation » de l'antigène par le sérum non marqué, il ne doit pas y avoir coloration des germes au deuxième temps.

Si cette coloration a lieu elle ne peut être attribuée à une réaction sérologique : le sérum est à éliminer.

Les résultats — tableau VIII — montrent bien qu'il n'y a pas de fluorescence après blocage alors que les témoins non bloqués sont nettement fluorescents.

TABLEAU IX

Temps de coloration avec un sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine

Numéros des essais	Temps de coloration					
	5'	10'	15'	20'	25'	30'
81	0	+	++	++	++	+++
82	0	+	++	++	++	+++
83	0	+	++	++	++	+++
84	0	+	++	++	++	+++
85	±	+	++	++	++	+++
86	0	+	++	++	++	+++
87	0	+	++	++	++	+++
88	±	+	++	++	++	+++
89	0	+	++	++	++	+++
90	0	+	++	++	++	+++

B. — ETALONNAGE DES SERUMS ANTIGLOBULINES MARQUES

Pour étalonner ce type de sérum il est évidemment nécessaire d'utiliser la technique de coloration indirecte. Aucune différence essentielle quant au principe de l'étalonnage avec ce qui a lieu pour les sérums antibactériens si ce n'est le premier temps de coloration. Une fois fixées les modalités de cette phase nous nous bornerons à donner les résultats observés.

Les frottis bactériens, fixés, sont mis en contact 30 minutes avec le sérum anti spécifique non marqué. Après 30 minutes de lavage en eau tamponnée phospha-

TABLEAU X

Temps de coloration avec un sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de rhodamine

Numéros des essais	Temps de coloration					
	5'	10'	15'	20'	25'	30'
91	0	0	±	+	++	+++
92	0	0	±	+	++	+++
93	0	0	0	+	++	+++
94	0	±	±	+	++	+++
95	0	0	±	+	++	+++
96	0	0	0	+	++	+++
97	0	0	±	++	++	+++
98	0	±	±	+	++	+++
99	0	0	0	+	++	+++
100	0	0	±	+	++	+++

tée pH 7,2, les lames sont égouttées soigneusement et séchées à l'exception de la surface du frottis.

Les essais d'étalonnage sont alors menés comme pour la coloration directe avec le sérum antiglobuline marqué.

1° Durée de coloration.

a) *Sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.* Tableau IX.

Nous constatons qu'à partir de 15 minutes de contact, nous obtenons de bonnes colorations de B. Anthracis. C'est ce temps qui sera utilisé.

TABLEAU XI

Temps de lavage pour des colorations avec un sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine

Numéros des Essais	Temps de lavage							
	5'		10'		15'		20'	
	T.	B.A.	T.	B.A.	T.	B.A.	T.	B.A.
101	±	++	±	++	0	+	0	++
102	+	++	±	++	0	++	0	+
103	±	++	0	++	0	++	0	+
104	±	++	±	++	0	++	0	++
105	+	++	0	++	0	++	0	++
106	+	++	0	++	0	++	0	++
107	+	++	±	++	0	++	0	++
108	+	++	0	++	0	++	0	++
109	+	++	0	++	0	++	0	+
110	+	++	0	++	0	++	0	++

b) *Sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de rhodamine.* Tableau X.

Il ressort de ce tableau que le temps minima efficace nécessaire à l'obtention d'une bonne coloration est de 25 minutes.

En deçà, nombreuses réactions douteuses.

2° Durée du lavage.

Les antisérums seront utilisés non dilués, les durées de coloration seront celles que nous venons de détermi-

TABLEAU XII

Temps de lavage pour des colorations avec un sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de rhodamine

Numéros des Essais	Temps de lavage							
	5'		10'		15'		20'	
	T.	B.A.	T.	B.A.	T.	B.A.	T.	B.A.
111	0	++	0	++	0	++	0	++
112	0	++	0	+	0	++	0	+−
113	±	++	0	++	0	++	0	+
114	0	++	0	++	0	++	0	+
115	0	++	0	++	0	++	0	++
116	±	++	0	++	0	++	0	++
117	±	++	0	++	0	++	0	++
118	0	++	0	++	0	++	0	++
119	0	+	0	++	0	++	0	++
120	0	++	0	++	0	++	0	++

ner : 15 minutes pour le sérum marqué à la fluorescéine et 25 minutes pour celui marqué à la rhodamine. La variante sera le temps de lavage. Témoins : frottis de B. Pumilus.

a) *Sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.* Tableau XI.

Après 5 minutes de lavage, les témoins sont légèrement colorés. Après 10 minutes : disparition incomplète de la fluorescence non spécifique ; nombreux cas douteux. 15 minutes sont nécessaires pour obtenir des témoins non colorés.

TABLEAU XIII

Taux de dilution d'un sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine

Numéros des Essais	Taux de dilution						
	P.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
121	++	++	++	++	+	±	0
122	++	++	+	++	+	±	0
123	++	++	++	+	±	0	0
124	++	++	++	++	+	0	0
125	++	++	++	++	+	±	0
126	++	++	++	++	±	0	0
127	++	++	++	++	±	0	0
128	++	++	++	++	+	±	0
129	++	++	++	++	±	0	0
130	++	++	++	++	+	0	0

b) *Sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de rhodamine.* Tableau XII.

Dix minutes de lavage suffisent pour éliminer toute fluorescence non spécifique.

3° Taux de dilution des sérums.

Les temps de coloration et de lavage seront : Sérum marqué à la fluorescéine : coloration 15', lavage 15' ; Sérum marqué à la rhodamine : coloration 25', lavage 10'.

Ces sérums seront dilués jusqu'au 64e, titre qui a

TABLEAU XIV

Taux de dilution avec un sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de rhodamine

Numéros des Essais	Taux de dilution						
	P.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
131	++	+	±	0	0	0	0
132	++	++	+	±	0	0	0
133	++	++	+	±	0	0	0
134	++	+	±	0	0	0	0
135	++	++	+	±	0	0	0
136	++	+	±	0	0	0	0
137	++	++	±	0	0	0	0
138	++	++	±	0	0	0	0
139	++	++	+	±	0	0	0
140	++	++	±	±	0	0	0

été établi lors de la vérification du taux précipitant après marquage.

Les résultats suivants ont été obtenus.

a) *Sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.* Tableau XIII.

Bonnes colorations jusqu'à la dilution au huitième au-delà apparition de cas douteux.

b) *Sérum antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de rhodamine.* Tableau XIV.

Au-delà de la dilution au demi le sérum n'a plus de pouvoir colorant certain. C'est à ce taux maximum qu'il peut être employé.

TABLEAU XV

Contrôle en coloration directe
des sérums antiglobulines marqués

Numéros des Essais	Nature des germes utilisés			
	B. Anthracis	B. Pumilus	E. rhusiopathiae	C. Botulinum
	1° Sérum marqué à la fluorescéine			
141	0	0	0	0
142	0	0	0	0
143	0	0	0	0
144	0	0	0	0
145	0	0	0	0
	2° Sérum marqué à la rhodamine			
146	0	0	0	0
147	0	0	0	0
148	0	0	0	0
149	0	0	0	0
150	0	0	0	0

4° Contrôle de la spécificité.

Ce contrôle diffère de celui des sérums antimicrobiens marqués. Il se réalise de deux façons.

Premièrement : en utilisant les sérums antiglobulines marqués en coloration directe. Les bacilles charbonneux ne contenant pas de protéines de cheval, les anticorps des sérums ne se fixent pas et sont éliminés au lavage. Aucune fluorescence ne doit apparaître.

Deuxièmement : un sérum antibactérien non mar-

TABLEAU XVI

Contrôle de la spécificité
à l'aide d'un sérum hétérologue marqué

Numéros des Essais	Sérum antirouget	
	Cheval témoin	Bœuf
	1° Sérum antiglobulines cheval marqué à la fluorescéine	
151	++	0
152	++	0
153	++	0
154	++	0
155	+	0
	2° Sérum antiglobulines cheval marqué à la rhodamine	
156	++	0
157	++	0
158	++	0
159	+	0
160	++	0

qué hétérologue au sérum antiglobulines marqué est utilisé dans le premier temps de coloration à la place du sérum homologue marqué. Les anticorps de ce sérum hétérologue se fixent sur les germes, mais ses globulines ne correspondant pas aux anticorps du sérum antiglobulines marqué, il n'y a pas fixation lors du deuxième temps de coloration. Les anticorps marqués sont entraînés par le lavage : donc pas de fluorescence visible sur les préparations.

a) *Essai en coloration directe des sérums antiglobulines cheval marqués à la fluorescéine et à la rhodamine* Tableau XV.

Comme antigène nous nous sommes servis de B. Pumilus, E. rhusiopathiæ et C. Botulinum.

Aucune fluorescence avec ces germes. Ces deux sérums peuvent être considérés comme spécifiques.

b) *Contrôle par un sérum antibactérien hétérologue non marqué.* Tableau XVI.

Ayant à notre disposition deux sérums antirouget préparés sur bœuf et sur cheval nous avons pris E. rhusiopathiæ comme antigène.

Dans un premier temps un lot a été traité avec le sérum rouget cheval : ce sera notre témoin ; l'autre avec le sérum rouget bœuf. Les deux sont ensuite colorés avec le sérum antiglobulines cheval marqué.

Les préparations traitées avec le sérum rouget bœuf ne présentent aucune fluorescence alors que celles qui l'ont été avec le sérum rouget cheval sont brillamment fluorescentes, autre preuve de spécificité.

C. — DISCUSSION

Si nous considérons l'ensemble des résultats obtenus nous sommes amenés à faire les constatations suivantes.

En comparant les temps optima de coloration que nous avons déterminé :

S. anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine : 20'

S. anticharbonneux marqué à l'isothiocyanate de rhodamine : 25'

S. antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine : 15'

S. antiglobulines cheval marqué à l'isothiocyanate de rhodamine : 25'.

Nous voyons que leur moyenne se situe sensiblement autour de 20 minutes, chiffre donné par la plupart des auteurs. Mais en réalité, ces temps sont différents pour chaque sérum considéré individuellement. Les écarts sont même très sensibles. Prenons par exemple le sérum antiglobulines cheval marqué à la fluorescéine, il demande 15 minutes pour donner de bonnes colorations alors qu'il en nécessite 25 pour sa version à la rhodamine, soit une différence de 10 minutes.

Or si nous considérons attentivement les tableaux détaillés des résultats, nous remarquons qu'une variation du temps de coloration de plus ou moins 5 minutes entraîne de nets changements dans la qualité de la fluorescence obtenue. Une légère sous coloration donne des préparations ternes, parfois difficilement lisibles. Inversement un excès de fluorescence risque d'entraîner des phénomènes optiques gênant l'interprétation des résultats, si ce n'est des pseudo-réactions qu'un accroissement du temps de lavage ne parvient pas toujours à éliminer.

On ne peut donc se contenter d'une durée moyenne de coloration lorsqu'on utilise les sérums fluorescents. La valeur des résultats est trop étroitement liée à ce temps pour qu'il ne soit pas indispensable de l'établir avec précision pour chaque sérum.

Si nous considérons maintenant les temps de lavage nécessaires que nous avons obtenus :

S. anticharbon marqué à la fluorescéine : 15'

S. anticharbon marqué à la rhodamine : 10'

S. antiglobulines cheval marqué à la fluorescéine : 15'

S. antiglobulines cheval marqué à la rhodamine : 10'.

Nous constatons tout d'abord que le temps minimum, dans tous les cas, est de 10 minutes. En deçà la décoloration est systématiquement incomplète. La fluorescence non spécifique, non fixée sélectivement, n'est pas éliminée en totalité et les impuretés ou les germes hétérologues demeurent plus ou moins visibles. L'identification des micro-organismes ne repose plus que sur une appréciation personnelle d'une simple différence d'intensité lumineuse. On conçoit, que dans ces circonstances la précision et l'efficacité de la technique soient pratiquement nulles alors qu'avec un temps convenable de décoloration, seuls apparaissent, brillants sur un fond de préparation obscur, les germes recherchés, réalisant ainsi une identification rapide.

D'autre part nous remarquons que les écarts entre les sérums sont relativement faibles, n'excédant pas 5 minutes. Aussi en pratique si l'on ne peut établir pour chaque sérum la durée précise de la décoloration, il est possible de prendre une moyenne que nous proposons de 15 minutes, maximum qui nous a été nécessaire avec nos sérums. On peut être alors assuré d'avoir de bonnes préparations d'autant plus que les risques de décoloration par excès sont moindres que par défaut. La marge de sécurité est beaucoup plus élevée, une atténuation de la fluorescence ne se faisant guère sentir qu'au delà de 30 minutes.

Nous avons obtenu de bonnes colorations en utilisant nos sérums aux dilutions suivantes :

S. anticharbon marqué à la fluorescéine : 1/4
S. anticharbon marqué à la rhodamine : Pur
S. antiglobulines cheval marqué à la fluorescéine : 1/8
S. antiglobulines cheval marqué à la rhodamine : 1/2

Nous relevons des écarts sensibles puisque, si les uns doivent être employés purs, d'autres peuvent l'être dilués du 8e. Ces différences risquent d'être beaucoup plus sensibles si nous utilisons des sérums à très forte teneur d'anticorps, ce qui doit être fait chaque fois que cela est réalisable.

Il est bien entendu toujours possible d'utiliser les sérums marqués non dilués. Pourquoi alors déterminer leur titre ? C'est que l'on risque, avec des sérums fortement fluorescents, d'avoir des préparations surcolorées avec tous les risques que cela comporte. Mais c'est surtout parce que l'on perd ainsi une part considérable de leur spécificité. GOLDWASSER a constaté que les sérums dilués voyaient le plus souvent disparaître leur faculté, si l'on peut dire, de colorer certains antigènes hétérologues, faculté liée à des causes encore indéterminées, que tous les procédés d'épuration ne parviennent pas à éliminer en totalité. C'est donc bien une nécessité que de connaître le taux de dilution maximum efficace des sérums marqués si l'on désire compter sur leur spécificité.

La spécificité de nos sérums s'est révélée bonne. Nous n'avons pas eu de réactions aberrantes. Cela est lié, semble-t-il en premier lieu, aux conditions rigoureuses de fabrication (les premiers essais ne nous ont pas donné, loin de là, de tels résultats) mais aussi à la bonne connaissance de nos sérums qui nous a permis de les utiliser dans les meilleures conditions.

CONCLUSION

Cette nouvelle technique de coloration par immunofluorescence a suscité un nombre considérable de travaux, ce qui peut s'expliquer par les résultats encourageants obtenus. Ces possibilités sont vastes aussi bien dans le domaine de la microbiologie, que dans ceux de l'histochimie et de l'immuno-physiologie.

C'est une technique relativement facile. La préparation des immunsérums marqués n'offre actuellement que peu de difficultés si l'on dispose du matériel indispensable et surtout de bons fluorochromes.

Elle nécessite cependant un véritable apprentissage. Les premiers résultats sont souvent décevants par leur médiocrité : mauvaises colorations, manque de spécificité. En réalité subsistent plusieurs écueils.

Une de ces difficultés réside dans la phase de coloration proprement dite. Les caractéristiques de chaque sérum varient sensiblement de l'un à l'autre même entre ceux qui, de même origine, même nature, sont marqués d'une façon identique par un même fluorochrome. Trop de facteurs entrent en jeu au cours du marquage pour qu'il puisse en être autrement.

Dans de telles conditions, il est bien évident que si l'on adopte une technique standard de coloration que l'on applique à tous les sérums, on n'obtienne que des résultats inconstants.

Plutôt que de s'essayer à acquérir empiriquement « le tour de main » nécessaire il nous est paru logique de chercher à connaître et à surmonter les causes de ces insuccès. C'est à quoi tend l'étalonnage des sérums.

Grâce à cet étalonnage, nous avons pu constater que s'il est possible de se contenter d'un temps moyen de lavage, il est indispensable de déterminer d'une manière précise les durées de coloration et les taux de dilution de chaque sérum. La constance, la précision et la spécificité de la technique s'en trouvent accrues.

Ainsi sera levée une des difficultés de l'immunofluorescence, ce qui contribuera à en faire un procédé pratique et valable d'investigation efficace et de détection rapide, véritable diagnostic d'alerte, sous réserve de confirmation par les autres techniques classiques de laboratoire.

Vu : *Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire,*
rapporteur :
SAURAT.

Vu : *Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire :*
P. PONS.

Vu : *Le Président de la Thèse :*
ANDRIEU.

Vu : *Le Doyen :*
LAZORTHES.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse le 5 mars 1962
Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :
Paul DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alexander (W.R.M.). — The application of fluorescent antibody technic to hemagglutining systems. *Immunology* 1958, *1*, 217-223.
2. Askonas (B.A.) and White (R.B.). — Sites of antibody production in the guinea-pig. The relation betwen in vivo synthesis and distribution of antibody contening plasma cells. *Brit. Exptl. Pathol* 1956, *37*, 61-74.
3. Baker (R.F.), Rapp (F.), Grogan (E.) and Gordon (I.). — Visualisation of measles virus in human cells. *Bacteriol. Proc.* 1957, 76.
4. Bardawil (W.A.), Toy (B.L.), Galins (N.) and Bayles (T.B.). — Dessiminated lupus erythematosus, scleroderma and dermatomyositis as manifestations of sensitization to D.N.A. protein. *Am. J. Pathol.* 1956, *34*, 607-629.
5. Baxter (J.H.) and Goodman (H.C.). — Nephrotoxic serum nephritis in rats. I. Distribution and specificity of the antigen responsible for production of nephrotoxic antibodies. *J. Exptl. Med.* 1956, *104*, 467-485.
6. Beutner (E.H.), Witebsky (E.) and Gerbasi (J.R.). — Organ specific reactions of thyroïd autoantisera from rabbits, dogs and humans as determined by the fluorescent antibody technic. *Federation Proc.* 1959, *18*, 559.
7. Beutner (E.H.), Witebsky (E.), Rose (N.R.) and Gerbasi (J.R.). — Localisation of thyroïd and spinal cord autoantibodies by fluorescent antibody technic. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1958, *97*, 712-716.
8. Beutner (E.H.). — Immunofluorescent staining. The fluorescent antibody methode. *Bact. rewiev* 1961, *25*, 1, 49-76.
9. Boand (A.V.), Kempf (J.E.) and Hanson (R.J.). — Phagocytosis of influenza virus. I. in vitro observation. *J. Immunol.* 1957, *79*, 416-421.
10. Borel (L.J.), Durel (P.). — L'immunofluorescence appliquée au diagnostic de la syphilis. *Pathol. Biol.* 1959, *7*, 2 317-2 324.
11. Borek (F.) and Silverstein (A.M.). — A new fluorescent label foi antibody proteins. *Arch. Bioch and Bioph.* 1960, *87*, 2, 293-97.
12. Boyer (J.S.), Denny (F.W.), Ginsberg (H.S.). — Intra-cellulax localisation of 4 adenovirus. II. Cytological and fluorescent labelled antibodies studies. *J. Exptl. Med.* 1959, *109*, 85-96.

13. Buckley (S.M.), Whitney (E.) and Rapp (F.). — Identification by fluorescent antibody of developmental forms of psittacosis virus in tissue culture. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1955, *90*, 226-230.

14. Buckley (S.M.). — Cytopathology of poliomyelitis virus in tissue cultures. Fluorescent antibody and tinctorial studies. *Am. J. Pathol.* 1957, *33*, 691-707.

15. Buckley (S.M.). — Visualisation of poliomyelitis virus by fluores cent antibody. *Arch. Ges. Virusforsch.* 1956, *6*, 388-400.

16. Carsky (T.R.). — Fluorescent antibody study of the simian foamy agent. *Federation proc.* 1958, *18*, 561.

17. Carter (C.H.). — Coloration de la coagulase à l'aide des anti-sérums fluorescents. *J. Bact.* 1959, *77*, 5, 670-677.

18. Carter (C.H.) and Leise (J.M.). — Specific staining of various bacteria with a sigle fluorescent antiglobulin. *J. Bact.* 1958, *76*, 152-54.

19. Carver (R.K.) and Goldman (M.). — Staining Toxoplasma gondii with fluorescein. Labelled antibody. III. The reaction in pozen and paraffin section. *Am. J. Clin. Pathol.* 1959, *32*, 159-164.

20. Censuales (S.), Garofalo (V.). — Anticorpi antitremonemia nella sifilide umana svelati conla reazione di fluorenza. *Riv. Inst. Seriotev. Ital.* 1959, *34*, 161-167.

21. Chadwick (C.W.), Mc Entegart (M.G.) and Nairn (R.C.). — Fluo-rescent protein tracers. A trial of new fluorochromes and the development of an alternatve to fluorescein. *Immunology* 1958, *1*, 315-327.

22. Cochrane (C.G.). — La technique des anticorps fluorescents. Applications à la microbiologie et au phénomène d'Arthus. *Ann. Inst. Pasteur* 1960, *99*, 3, 329-349.

23. Cochrane (C.G.), Vasquez (J.J.) and Dixon (F.J.). — The specific localisation of antigan in lesions of experimental serum sickness. *Am. J. Pathol.* 1957, *33*, 593-594.

24. Coffin (N.) and Liu (C.). — Studies on canine distemper infection by the means of fluorescein labeled antibody. II. The pathology and diagnosis of the naturally occuring disease in dogs and the antigenic nature of the inclusion body. *Vuology* 1957, *3* ; 132-145.

25. Cohen (F.), Zuelzer (W.W.) and Evans (M.M.). — Identification of blood group antigens and minor cell populations by fluorescent antibody method. *Blood.* 1960, *15*, 884-900.

26. Cohen (S.M.), Gordon (I.), Rapp (F.), Macaulay (J.C.) and Buck-ley (S.M.). — Fluorescent antibody and complement fixation tests of agents isolated in tissue cultures from measles patients. *Exptl. Biol. Med.* 1955, *90*, 118-122.

27. Cohn (E.J.), Gurd (F.R.N.) and Surgenor (D.M.). — A system for the separation of component of huma blood. *J. Am. Chem. Soc.* 1950, *72*, 465-474.

28. Coons (A.H.), Leduc (E.H.) and Kaplan (M.H.). — Localization of antigen in tissue cells. VI. The fate of injected foreign proteins in the mouse. *J. Exptl. Med.* 1951, *93*, 173-188.

29. Coons (A.H.). — Histochemistry with the labeled antibody. International review of cytology vol. 5, pp. 1, 23. *Academic Press.*

30. Coons (A.H.). — Labeled antibody and antigens. *Ann. Rev. Microbiol.* 1954, *8*, 333-352.

31. Coons (A.H.). — The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occuring antigens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1957, *69*, 658-662.

32. Coons (A.H.). — Fluorescent antibody methods. In general cytochemical methods. Vol. 1, pp. 399-442. Edited by J.F. Danielli. *Academic Press Inc. New-York.*

33. Coons (A.H.). — The cytology of antibody formation. *J. Cellular Comp. Physiol.* 1959, *52*, 55-67.

34. Coons (A.H.). — Antibodies and antigen labelled with fluorescein. *Scheiz. Z. Pathol. U. Bakteriol* 1959, *22*, 693-699.

35. Coons (A.H.). — The diagnostic application of fluorescent antibodies. *Scheiz. Z. Pathol. U. Bakteriol.* 1959, *22*, 700-723.

36. Coons (A.H.), Creech (H.J.), Jones (R.N.) and Berliner (E.). — The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* 1942, *45* ; 157-170.

37. Coons (A.H.) and Kaplan (M.H.). — Localization of antigen in cells. II. Improvement in a method of the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exptl. Med.* 1950, *91*, 1-13.

38. Coons (A.H.), Leduc (E.H.) and Conolly (J.M.). — Studies on antibodies production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its applications to the study of the hyperimmune rabbit. *J. Exptl. Med.* 1955, *102*, 49-60.

39. Coons (A.H.), Leduc (E.H.) and Kaplan (M.H.). — Localization of antigen in tissue cells. VI. The fate of injected foreign protein in mouse. *J. Exptl. Med.* 1951, *93*, 173-188.

40. Crawford (H.J.), Wood (R.M.) and Lessof (M.H.). — Detection of antibodies by fluorescent spot technic. *Lancet* 1959, *2*, 1173-1174.

41. Creech (H.J.) and Jones (R.N.). — Conjugates synthetized from various proteins and the isocyanate of certain aromatic Polynucl hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 1941, *63*, 1661-1669.

42. Cremer (N.) and Watson (D.W.). — Influence of stress on distribution of entero toxin in RES determined by fluoresceins antibody technic. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1957, *95*, 510-513.

43. Cruickshank (B.) and Currie (A.R.). — Localization of tissue antigens with the fluo rescent antibody technic : application to human anterieur pituitary hormones. *Immunology* 1958, *1*, 13-26.

44. Cruickshank (B.) and Hill (A.G.S.). — The histochemical identification of a connective tissue antigen in rat. *J. Pathol. Bacteriol* 1953, *66*, 282-289.

45. Curtain (C.C.). — Electrophoresis of fluorescent antibody. *Nature* 1958, *182*, 1305-1306.

46. Dacres (W.G.) and Groth (A.H.). — Identification of Erysipelothrix insidiosa with fluorescent antibody. *J. Bacteriol* 1959, *78*, 298-299.

47. Dahaner (T.H.), Friou (G.J.) and Finck (S.C.). — Fluorescein labeled antiglobulin test applied to leukocyte. *Clin Research*, 1957, *5*, 9.

48. Davenport (F.M.), Hennessy (A.V.) and Francis (S.). — *J. Exptl. Med. 98*, 641.

49. Deacon (W.E.), Falcon- (V.H.) and Harris (S.). — A fluorescent test for treponemal antibodies. *Proc. Expertl. Bioi. Med.* 1957, *96*, 477-480.

50. De Repentigny (J.) and Frappier (A.). — Studies on hemophilus pertussis liquid cultures. III. Localization on surface antigen by means of fluorescent antibody. *Can. J. Microbiol* 1956, *2*, 677-683.

51. De Repentigny (J.). — Some limitations in the use of the fluorescent antibody. *Rev. Canada Biol.* 1958, *17*, 492-502.

52. Dixon (F.J.) and Vasquez (J.J.). — Immunohistochemical analysis of hypersensibility and related lesions. *In Mechanims of hypersensitivity* 1959, pp. 191-196. Edited by Schaffer, Little, Brown and Cie, Boston.

53. Dixon (F.J.), Vasquez (J.J.), Weigle (W.O.) and Cochrane (C.G.). — Immunology and pathogenesis of experimental serum sickness. *Arch. Pathol.*, 1958, *65*, 18-28.

54. Dixon (F.J.), Weigle (W.O.) and Roberts (J.C.). — Comparaison of antibody reponses associed With transfer of rabbit lymph node peritoneal excudate and thymus cells. *J. Immunol.* 1957, *78*, 56-62.

55. Dowdle (W.R.) and Hansen (P.A.). — Labeling of antibodies with fluorescentazodyes. *J. Bacteriol* 1959, *77*, 5, 669-70.

56. Eaton (M.C.), Meikelsohn (G.) and Van Herick (W.). — Studies on the etiology of primary atypical pneumonia. *J. Expit. Med.* 1944, *79*, 649-668.

57. Emmart (E.W.). — Observation on the absorption spectra of flurocescein, fluorescein derivates and conjugatès. *Arch. Biochim. Biophys.* 1958, *73*, 1-8.

58. Emmart (E.W.), Cole (R.M.), May (E.L.) and Longley (J.B.). — Studies on streptococcal hyaluronidase and anti-hyaluronidase. II. Localization of sites of absorption with fluorescent antibody. *J. Histochem. and cytochem.* 1954, *6*, 171-173.

59. Enders (J.F.). — Recent observations on the behavior in tissue cultures of certain virus pathogenic for man. *Natl. Inst. Health. Ann : Lectures* 1954, 121, 135.

60. Enders (J.F.). — Observations on certain virus causing exanthematous deseases in man. *Am. J. Med.* 1956, *231*, 622-637.

61. Etchebarne (M.), Beinal (P.G.) and Leyton (G.R.). — Purification des anticorps rabiques et importance du diagnostic par la technique des anticorps fluorescents. *J. Immunol.* 1960, 84, *4*, 426-433.

62. Finck (H.), Holtzer (H.) and Marschall (J.M.). — An immunochemical study of the distribution of myosin in glucera extracted muscle. *J. Biophys. Biochem. Cythol. suppl.* 1956, *2*, 175-178.

63. Finck (H.) and Holtzer (H.). — An immunochemical comparison of various motile systems. *Anat. Record* 1960, *136*, 153-194.

64. Finkelstein (R.S.) and La Brec (E.H.). — Identification rapide du vibrion cholérique par les anticorps fluorescents. *J. Bacteriol* 1959, *78*, 6, 886-889.

65. Fisher (E.R.) and Fischer (G.). — Investigation of rejection of canine renal homotransplants by fluorescent antibody. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1959, *101*, 259-261.

66. Franco (J.C.), Eyquem (S.), Grabar (P.). — L'analyse électrophorétique en fluorescence. *Rev. Franç. d'Etudes Clin. et Biol.*, 1959, *4*, 6, 821-822.

67. Friou (G.J.). — Clinical application of a test for lupus globulin nucleohistone interaction using fluorescent using fluorescent antibody. *Yale J. of Biol. Med.* 1958, *31*, 40-47.

68. Friou (G.J.). — Identification of nuclea component of interaction of lupus erythematosus globulin and nuclis. *J. Immunol.* 1958, *80*, 476-481.

69. Friou (G.J.). — The significance of the lupus globulin nucleo protein reaction. *Ann. Internal. Med.* 1958, *49*, 866-875

70. Friou (G.J.), Finch (S.C.) and Detre (K.D.). — Nuclea localization of a factor from disseminated lupus serum. *Federation Proc.* 1951, *16*, 413.

71. Friou (G.J.), Finch (S.C.) and Detre (K.D.). — Interaction of nuclea and globulin from lupus erythematosus serum demonstrated with fluorescent antibody. *J. Immunal* 1958, *80*, 324-329.

72. Germuth (F.G.), Maumenée (A.E.), Pratt, Johnson (T.H.). — Observation on the side and mechanisms of antigen antibody interaction in anaphylactic Hypersentivity. In Mechanism of hypersentivity. *Edited by J. Sheiffer, Little, Brown and Co.*

73. Gitlin (O.) and Craig (J.M.). — Variations in staining characteristics of huma fibrin. *Am. J. Pathol.* 1957, *33*, 267-283.

74. Gitlin (D.), Craig (J.M. and Janeway (C.H.). — Studies on the nature of fibrinoïd in the collagen deseases. *Am. J. Pathol.* 1957, *33*, 55-77.

75. Glynn (L.E.), Holborow (E.J.) and Johnson (G.D.). — The distribution of blood-group substances in human gastric and duodenal mucosa. *Lancet* 1957, *2*, 1083-1088.

76. Goldman (M.). — Use of fluorescein-tagged antibody to identify cultures of Entamoeba histolytica. *Am. J. Hyg.* 1954, *59*, 318-327.

77. Goldman (M.). — Staining toxoplasma Gondii with fluorescein labelled antibody. I. The reaction in smears of peritoneal exçudate. *J. Exptl. Med.* 1957, *105*, 549-556,

78. Goldman (M.). — II. A new serologic test for antibody to toxoplasma based upon inhibition of specific staining. *J. Exptl. Med* 1957, *105*, 557-573.

79. Goldman (M.) and Carver (R.K.). — Preserving fluorescein isocyanate for simplified preparation of fluorescent antibody. *Science*, 1957, *126*, 839-840.

80. Goldstein (M.N.), Hiramoto (R.) and Pressman (D.). — Comparative fluorescein labelling and cytotoxic ty studies with human cells strain He La. *J. Natl. Cancer Inst.* 1959, *22*, 697-705.

81. Goldwasser (R.S.) and Kisling (R.E.). — Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Bull. World Health Organisation*, 1959, *20*, 579-588.

82. Goldwasser (R.A.) and Kissling (R.E.). — Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in salivery glands. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1958, *98*, 219-223.

83. Goldwasser (R.A.) and Shepard (C.C.). — Staining of complement and modifications of flurescent antibodies procedures. *J. Immunol.* 1958, *80*, 122-131.

84. Goldwasser (R.A.) and Shepard (C.C.). — La méthode des anticorps fluorescents pour la différenciation du Typhus murin et épidémique. *J. Immunol.* 1959, *82* ; 373-380.

85. Goodman (H.C.), Fahey (T.L.), Malmgren (R.A.) and Brecher (G.). — Separation of fractions in lupus erythematoxus serum reacting with component of cell nuclea. *Lancet* 1959, *2*, 282-283.

86. Gordon (M.A.). — Differenciation of yeasts by means of fluorescein antibody. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1958, *97*, 694-698.

87. Halperen (S.), Donaldson (P.) and Sulkin (S.E.). — Identification of streptococci in bacterial mixtures with fluorescent antibody. *J. Bacteriol.* 1958, *76*, 223-224.

88. Hanson (R.J.), Kempf (J.E.) and Boand (A.V.). — Phagocytosis of influenza virus. *J. Immunol.* 1957, *79*, 422-427.

89. Hargraves (M.M.), Richmond (H.) and Morton (R.). — Presentation of two bones marow elements the « tart » cell and L.E. cell. *Proc. Straff Meetings Mayo Clinic*, 1958, *23*, 25-28.

90. Hill (A.G.S.) and Cruikshank (B.). — A study of antigenic components of Kidney tissu. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 1953, *34*, 27-34.

91. Hiramoto (R), Goldstein (M.) and Pressman (D.). — Reaction of antisera prepared againt Hela cells and normal foetal liver cells with adult human tissues. *Cancer Res.* 1958, *18*, 583-586.

92. Hiramoto (R.), Engel (K.) and Pressman (D.). — Tetramethyl rhodamine an immunohistochemical fluorescent label in the study of chronic thyroïdies. *Proc. Soc. Biol. Med.* 1958, *97*, 611-614.

93. Hiramoto (R.), Jurandowski (J.), Bernecy (J.) and Pressman (D.). — Precise zone of localization of antikidney antibody invarious organs. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med* 1959, *101*, 583-586.

94. Horson (P.N.) and Mann (S.O.). — Some studies on the identification of rumen bacteria with fluorescent antibodies. *J. Gen. Microbiol.* 1957, *16*, 463-471.

95. Holborow (E.J.), Brow (P.), Roitt (I.M.) and Doniach (D.). — Cytoplasmic localization of complement fixing auto antigen in human thyroïd epithelium. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 1959, *40*, 583-588.

96. Holborow (E.J.) and Weir (D.M.). — Histone : an essentiel component for the lupus erythematosus antinecluear reaction. *Lancet*, 1959, *1*, 809-810.

97. Holborow (E.J.), Weir (D.M.) and Johnson (G.D.). — A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Brit. Med. J.* 1957, *2*, 732-734.

98. Holtzer (H.), Marshall (J.M.) and Finck (H.). — An analysis of myogenesis by the use of fluorescent antimyosin. *J. Bioph. Biochim. Cytol.* 1957, *3*, 705-724.

99. Humphrey (J.H.). — Origin of bloods platelets. *Nature*, 1955, *176*, 38.

100. Kabanova (E.A.) and Glubokina (A.J.). — The use of antibodies labelled with fluoresceine for the detection of dysentery bacilli. I. *Zhuv. Mikrobiol. Epidemiol ; Immunobiol.* 1958, *1*, 5-8.

101. Kabat (E.A.) and Mayer (M.M.). — Experiment. Immunochemistry, 1948, C.C. Thomas Springfield.

102. Kaplan (M.H.). — Immunologic studies of heart tissue I. *J. Immunol.* 1958, *80*, 254-267.

103. Kaplan (M.H.). — Immunologic studies of heart tissue II. *J. Immunol.* 1958, *80*, 268-277.

104. Kaplan (M.H.). — Localization of streptococcal antigens in tissues. Histologic distribution and persistance of M. Proteins in the tissues of mice. *J. Exptl. Med. 107*, 341-352.

105. Kaplan (M.H.). — Autoantibodies to heart tissue in the sera of certain patients with rhumatic fiver. *Federation Proc.* 1959, *18*, 576.

106. Kaufman (L.) and Cherry (W.B.). — Technical factors affecting the preparation of fluorescent antibody reagents. *J. Immunol.* 1961, 87, *1*, 72-79.

107. Kay (F.C.). — The mechanism of a form of glumeronephristis. *Am. J. Med. Sci.* 1942, *204*, 483-490.

108. Kies (E.S.T.), Hugues (P.G.) and Louis (C.T.). — The species non specificity of globulins in the globulin-fluorescein staining. *Brit. J. Cancer* 1958, *12*, 5-13.

109. Kies (M.W.) and Alvord. — In allergic Encephalomyelitis. Chap. 8-13. *C.C. Thomas, Springfield Illinois*, 1959.

110. King (E.S.J.), Hugues (P.E.) and Louis (G.J.). — *Brit J. Cancer*, 1958, *12*, 5-13.

111. Klatzo (I), Horvath (B.) and Emmart (E.W.). — Demonstration of myosin in human striated muscle by fluorescent antibody. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1958, *97*, 135-140.

112. Klein (P.) and Burkholder (P.). — Die Darstellung von fixiertem Komplement mit Markiertem antikomplement. *Schweiz. Z. Pathol. U. Bakteriol.* 1959, *22*, 729-731.

113. Labrec (E.H.), Formal (S.B.) and Scheider (H.). — Identification sérologique de Shigella Flexneri par les anticorps fluorescents. *J. Bactériol.* 1959, *78*, 3, 384-391.

114. Koch (E.C.) and Mc Meckin. — *J. Am. Chem. Soc.* 1950, *91*, 15.

115. Lacy (P.G.) and Davies (J.). — Preleminary studies on the demonstration of insulinislets by the fluorescent antibody technic. *Diabetes*, 1957, *6*, 354-357.

116. Larionov (A.P.) et Kuz'Miss (N.A.). — Détection des agents de toxi infection à l'aide des anticorps fluorescents. *Veterinarya* (*U.R.S.S.*) 1959, *36*, 3, 68-73.

117. Lebrun (J.). — Cellular localization of herpes simplex virus by means of antibody fluorescent. *Virology* 1956, *2*, 496-510.

118. Lebrun (T.). — L'antigène polyomeylitique au cours du développement intra cellulaire du virus. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, *93*, 225-229.

119. Lessof (M.H.), Crawford (H.J.) and Wood (R.M.). — Antibody to thyroglobulin in patients with thyroïd deseases. *Lancet*, 1959, *2*, 1172-1173.

120. Liu (C.). — Rapid diagnostic of human influenze infection by means of fluorescent antibody. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1956, *92*, 883-887.

121. Liu (C.). — Studies on primary atypical pneumonia. I. localization, isolation and cultivation of a virus. *J. Exptl. Med.* 1957, *10c*, 455-466.

122. Liu (C.) and Coffin (D.L.). — Studies of canine distemper infection by the means of fluarescein labelled antibody. *Virology*, 1957, *3*, 115-131.

123. Liu (C.) and Eaton (M.D.). — Study and isolation of primary atypical pneumonia virus in chick embryos by means of fluorescent labelled antibody. *Bacteriol. Proc.* 1955, 61.

124. Liu (C.), Eaton (M.P.) and Heyl (J.T.). — Study on primary atypical pneumia. II. *Exptl. Med.* 1959, *109*, 545-556.

125. Liu (C.) and Heyl (J.T.). — Serological study on primary atypical pneumonia. *Federation Proc.* 1957, *16*, 423.

126. Louis (C.J.). — The significance of the cell type in the fluorescein globulin staining of tissues. *Brit. J. Cancer*, 1953, *12*, 537-546.

127. Mc Entegart (M.G.), Chadwick (C.S.) and Nairn (R.C.). — Flurexent antisera in detection of serological varietes of Trichomonas, *Brit. J. Vener Dis.* 1958, *34*, 1, 1-3.

128. Mc Kinnon (G.E.), Andrews (E.C.), Heptinstall (R.H.). — An immunohistologic study on the occurence of intravassular antigen, antibody precipitation. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1957, *101*, 258-280.

129. Marschall (J.D.), Eveland (W.C.) and Smith (C.W.). — Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1958, *98*, 898-900.

130. Marschall (J.D.), Eveland (W.C.), Smith (C.W.) and Harr (J.R.). — Fluorescent antibodies studies of Erysipelothrix insidiosa. *Bacteriol. Proc.* 1959, 90.

131. Marshall (J.M.). — Localization of adrenocorticotropic hormone by histochemical and immunochemical methods. *J. Exptl. Med.* 1951, *94*, 21-29.

132. Mayersbach (H.). — Unspecific interactions between serum and tissue sections in the fluorescent antibody technic. *J. Histochem. and Cytochem.* 1959, 7, 427.

133. Mejsel (M.V.), Kabanota (E.A.). — Diagnostic sérologique et par immunofluorescence des colonies d'entérobactériacées. *Dokl. Akad. Nauk (U.R.S.S.)* 1959, *125*, 1, 205-207.

134. Mellors (R.C.). — Fluorescent antibody Method. *Analytical cytology*, pp. 1, 67. *Mc Graw Hill Book CO*, 1959.

135 Montgomery (C.H.), Suhrland (S.) and Knox (J.M.). — Observations concerning fluorescent treponemal antibody test. *J. Invest. Derm.* 1960, *35*, 95-101.

136. Moody (M.D.), Ellis (E.C.) and Thomasson (B.M.). — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. I. General method for Malleomyces pseudomallei. *J. Bacteriol.* 1956, *72*, 357-361.

137. Moody (M.D.), Ellis (E.C.) and Upnyke (E.L.). — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. IV. grouping streptococci. *J. Bacteriol.* 1958, *75*, 353-360.

138. Moody (M.D.), Thomasson (B.M.), Winter (C.C.) and Hall (H.D.). — Sensitivity of bacterial agglutination and fluorescent antibody reactions. *Bacteriol Proc.* 1959, 89.

139. Moody (M.D.) and Winter (C.C.). — Rapid identification of Pasteurella pestis with fluorescent antibodies. *J. inf. Dis.* 1959, *104*, 3, 274-280, 281-287, 288-294.

140. Moulton (J.E.). — Fluorescent antibody studies of demyelination in canine distemper. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1956, *91*, 460-464.

141. Nairn (R.C.), Fraser (K.B.) and Chadwick (C.S.). — The histological localization of renin with fluorescent antibody. *Bit. J. Exptl. Pathol.* 1959, *40*, 155-163.

142. Neil (A.L.) and Dixon (F.J.). — Immunohistochimical detection of antibody in cell-transfer studies. *J. Exptl. Med.* 1959, *67*, 643-649.

143. Noyes (W.F.) and Watson (B.K.). — Studies on the increase of vaccine virus incultured human cells my means of the fluorescent antibody technic. *J. Exptl. Med.* 1955, *102*, 237-242.

144. Noyes (W.F.). — Visualization of Egypt 101 virus in the mouse's brain and in cultured human carcinoma cells by fluorescent antibody. *J. Exptl. Med.* 1955, *102*, 243-248.

145. Noyec (W.F.) and Mellors (R.C.). — Fluorescent antibody detection of the antigen of Shope papilloma Virus. *J. Exptl. Med.* 1957, *106*, 555-562.

146. Ohta (S.), Zak (S.) and Singer (E.G.). — Immunohistochemical studies of spleen and liver. *Federation Proces*, 1959, *18*, 497.

147. Olansky (S.) and Mc Cormick (G.E.). — Experience with the fluorescent treponemal antibody test for syphilis. *A.M.A. Arch. Dermatol.* 1960, *81*, 59-66.

148. Ortesa (L.G.) and Mellors (R.Ç.). — Analytical pathologie. The role of the localizing antibodies in the pathogenis of nephotoxis nephritis in rats. A fluorescent antibody study. *J. Exptl. Med.* 1956, *104*, 151-170.

149. Ortega (L.G.) and Mellors (R.C.). — Cellular sites of formation of gama-globulin. *J. Exptl. Med.* 1957, 106, 627-640.

150. Predulin (P.I.) et Kuz'Min (N.A.). — Diagnostic rapide à l'aide des anticorps fluorescents. *Veterinarya Moscow* 1959, *36*, 7, 69-73.

151. Proom (H.). — *J. Pathol. Bacteriol* 1943, *55*, 419.

152. Rapp (F.), Seligman (S.J.), Jaross (L.B.) and Gordon (I.). — Quantitative determination of injections units of measles virus by count of immunofluorescent foci. *Proc. Soc. Exptl. Biol Med.* 1959, *34* ; 1081-1097.

153. Riggs (J.L.), Seiwald (R.S.), Burckhalter (J.H.), etc... — Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am. J. Pathol.* 1958, *34*, 1081-1097.

154. Roberts (D.C.S.). — Studies on the antigenic structure of the eye, using the fluorescent antibody technic. *Ophtalmol* 1957, *41*, 338-347.

155. Schiller (A.A.), Schayer (R.W.) and Hess (E.L.). — Fluorescein conjuged bovine albumine Phycal and biological proprietes. *J. Gen. Physiol.* 1953, *36*, 489-505.

156. Schmidt (W.C.). — Group A stretococcus polysacharide : studies on preparation, composition and cellular localization after exfra veinous injections. *J. Exptl. Med.* 1952, *95*, 105-119.

157. Seegal (B.C.). — In vivo, localization of specifi antiorgan sera relation to occuring of renal lesion. *In Mechanisms of hypersensitivity* 1956, pp. 143-154. Edited par Shaffer, Little, Brown and Co Boston.

158. Schmidt (W.C.), Marschall (J.D.) and Evelant (W.C.). — Investigations on Listeria monocytogenes by fluorescent antibody. *Bacteriol Proc.* 1959, *91*.

159. Szulman (A.E.). — Histochemical distribution of blood group antigens A and B in human tissues. *Federation Pro.* 1959, *18*, 509.

160. Tanaka (N.) and Leduc (E.H.). — A study of the cellular distribution of Forsmann antigen in various species. *J. Immunol.* 1956, 77, 198-212.

161. Thivolet (S.), Grospiron (D.) et Murat (M.). — Mise en évidence par les techniques et immunofluorescence d'anticorps au cours de l'infection syphilitique. *Ann. Inst. Pasteur* 1960, *99*, 920-924.

162. Slack (J.M.), Winger (A.) and Moore (D.W.). — Serological grouping of actinomyces by means of fluorescent antibodies. *J. Bacteriol* 1961, *82*, 54-65.

163. Spagnoli (U.), Mannuci (E.). — Primi resulti con la reazione di fluorescenza applicata alla serodiagnosi della sifilid. *Rassegna di Deim. et di Sif* 1960, *13*, 323-336.

164. Thomasson (B.M.), Cherry (W.F.) and Edwards (P.R.). — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. VI. Identification of Salmonellae in fecal specimens. *J. Bacteriol*, 1959, *77*, 478-481.

165. Thomasson (B.M.), Cherry (W.B.) and Ewing (W.H.). — Rapid identification of serotypes of Escherichia coli with polyvalent antibody solutions labelled with fluorescents. *Bacteriol Proc.* 1959, 90.

166. Thomasson (B.M.), Cherry (W.B.) and Moody (M.D.). — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. III. Antigenic analysis of Samonella typhosa by means of fluorescent antibody and agglutining reactions. *J. Bacteriol* 1957, *74*, 525-532.

167. Thomasson (B.M.), Moody (M.D.) and Goldman (M.). — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. II. Rapid detection of Malleomyces pseudomallei in contaminated material. *J. Bacteriol* 1956, *72*, 362-367.

168. Tunik (B.D.) and Holtzer (H.). — Localization of muscle antigens in contracted sarcomers by means of fluorescein labeled antibodies. *Ann. Record*, 1960, *136*, 294-295.

169. Uehleke (H.). — Neue Moglichkeinten zur Herstellung fluoreszenz markierter Protein. *Z. Naturforsch* 1958, *13 B*, 722-724.

170. Uehleke (H.). — Untersuchungen mit fluoreszenz markierten Antikörpen. IV. Die Markierung von Antikörpen mit sulfochloriden fluoreszierender farbstoffe. *Schweiz. Z. Pathol. U. Bakteriol* 1959, *22*, 724-729. kk

171. Vasquez (J.J.) and Dixon (F.J.). — Immunohistochemical study of lesions in rheumac tic fever, systematic erythematosus and rheumatoïd arthritis. *Lab. Invest.* 1957, *6*, 205-217.

172. Vaisman (A.) et Hamelin (A.). — Application au diagnostic sérologique de la syphilis de la méthode d'immunofluorescence. *Presse Médicale*, 1961, *69*, 26, 1157-1159.

173. Vozza (R.), Paulozzi (S.). — Imprezo della degli anticorpi fluorescenti nella cherati cunjunctivite vaccinala sperimental. *Riv. Instit. Sierot. Ital.* 1959, *34*, 818-834.

174. Watson (B.K.). — Mixed infections with influenza and mumps virus in the chick embryo. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 1956, *32*, 169.

175. Weber (G.). — Polarization of the fluorescent of macromolecules. II. Fluorescent conjugates of ovoalbumine and bovin serum. *Bichem. J.* 1952, *51*, 155-167.

176. WEILER (E.). — Die Anderung der serologischen Spezifität von Leberzellen der Ratte während der Cancerogenese durch p. Dimethylaminoazobenzol. *Z. Naturforsch.*, 1956, *11 B*, 31-38.

177. WEILER (E.). — Antigenic differences between normal hunster Kidney and stilboestrol-induced Kidney carcinoma. Histological demonstration by means of fluorescent antibodies. *Brit. J. Cancer*, 1956, *10*, 560-563.

178. WELLER (T.H.) and COONS (A.H.). — Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagative in vitro. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1954, *86*, 789-794.

179. WHITAKER (J.), ZVELZER (W.W.), ROBINSON (A.R.) and EVANS (M.). — The use of fluorescent antibody technic for the demonstration of erythrocyte antigens. *J. Lab. Clin. Med.* 1959, *54*, 282-283.

180. WITAKER (J.), PAGE (R.H.), STULBERY (C.S.) and ZULZER (W.W.). — *Am. J. Dis. Child.* 1958, *95*, 1.

181. WHITE (R.G.). — Observations on the formation and nature of Russel bodies. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 1954, *35*, 365-370.

182. WHITE (R.G.). — An immunological investigation of Hashimoto's desease. *Proc. Roy. Med.* 1957, *50*, 953-954.

183. WHITE (F.H.), RISTIC (M.). — Detection de Leptospina pomana dans l'urine du cobaye et du bœuf par les anticorps fluorescents. *J. Inf. Disc.* 1959, *105*, 2, 118-123.

184. WIDELOCK (D.), GILBERT (G.) and SIEGEL (M.). — Fluorescent antibody procedure for lupus erythoematosus. Comparative use of Nucleated erythrocytes and calfthymus cells. *J. Pub. Health* 1961, *51*, 6, 829-835.

185. WITERSKY (E.), ROSE (N.R.), TERPLAW (K.), PAINE (J.R.) and EGAN (R.W.). — Chronic thyroïdites and auto immunization. *J. Am. Med. Assoc.* 1957, *164*, 1439-1447.

186. WITEBSKY (E.) and STEINFELD (J.). — *Z. Immunforch*, 1938, *58*, 271-296.

187. WITMER (R.H.). — Antibody formation in rabbit eye studied with fluorescein-labelles antibody. *A.M.A. Arch. Ophtalmol.* 1955, *53*, 811-816.

188. WOLOCHOW (H.). — Marquer fluorescent for anticorps. *J. Bacteriol* 1959, *77*, 164-166.